
**Verwendung von Keimzahlbestimmungen
zur Abschätzung des biologischen Ölabbaus.
Eine Komponente der biologischen Maßnahmen
bei Ölkontamination von Wattsedimenten.**

vom Fachbereich Biologie
der Universität Oldenburg
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
angenommene Dissertation

1988

vorgelegt von

Monika Michaelsen

geb. am 12.05.1954
in Brilon-Wald

Ulrike Kant

geb. am 11.10.1956
in Hamburg



Erstreferentin: Dr. L. Berthe-Corti
Koreferent: Prof. Dr. Th. Höpner

Tag der Disputation: 31.08.1988

**Verwendung von Keimzahlbestimmungen
zur Abschätzung des biologischen Ölabbaus.
Eine Komponente der biologischen Maßnahmen
bei Ölkontamination von Wattsedimenten.**

vom Fachbereich Biologie
der Universität Oldenburg
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
angenommene Dissertation

vorgelegt von

Monika Michaelsen

geb. am 12.05.1954
in Brilon-Wald

Ulrike Kant

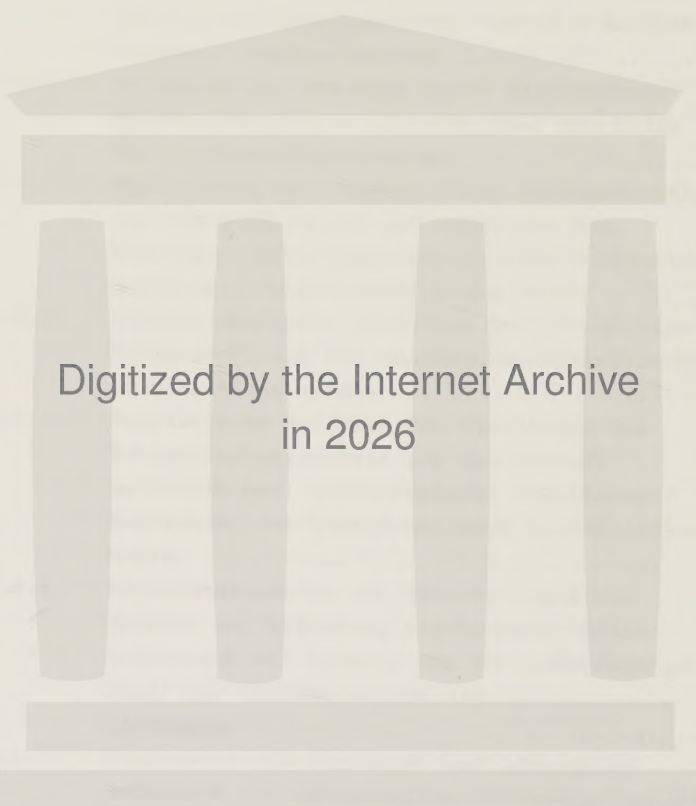
geb. am 11.10.1956
in Hamburg

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>Einleitung</u>	1
2.	<u>Material und Methoden</u>	12
2.1.	Chemikalien	12
2.2.	Organismen	12
2.3.	Medien und Lösungen	13
2.4.	Vorkulturen	14
2.4.1.	Reine Stämme	14
2.4.2.	Wattmischpopulation	14
2.5.	Methoden	15
2.5.1.	Biotrockenmasse-Bestimmung (BTM)	15
2.5.2.	Kulturen zur Bestimmung des Kohlenwasser- stoffabbaus in Wattsedimenten	15
2.5.3.	Fluoreszenzmikroskopie	16
2.5.4.	Keimzahlbestimmungen	17
2.5.5.	Sedimentkernprobenahme und Flüssiginkubation	19
2.5.6.	Qualitative Auswertung des Bakterien- wachstums in Kulturröhrchen	20
2.6.	Freilandarbeiten	21
2.6.1.	Lage und sedimentologische Charakterisierung der Versuchsfelder sowie der Probenahmeorte für die Laborarbeiten	21
2.6.2.	Auswahl, Bezeichnung und Anlage der Versuchs- felder für die Freilandarbeiten	25
3.	<u>Ergebnisse</u>	33
3.1.	Freilanduntersuchungen zum mikrobiellen Kohlenwasserstoffabbau in Wattsedimenten	33
3.2.	Laboruntersuchungen zum mikrobiellen Kohlen- wasserstoffabbau in Wattsedimenten	50
3.3.	Untersuchungen zur Zerteilung von Mikro- organismen-Aggregaten sowie zur Abtrennung von Mikroorganismen von Sedimentpartikeln ...	70
3.4.	Keimzahlbestimmung ölabbauender Mikro- organismen - Entwicklung und Problematik eines Bestimmungsverfahrens	74

3.4.1.	Problematik der Lebendkeimzahlbestimmung (TCFU) ölabbauender Mikroorganismen des Agarplatten-Verfahrens	75
3.4.2.	Gesamtkeimzahlbestimmung ölabbauender Mikroorganismen unter Verwendung von Flüssigmedien bei Einsatz geringer Volumina (0,3 ml Testvol.) - Mikrotiterplatten - sowie 5 ml Testvolumen - Kulturröhrchen	81
3.4.2.1.	Erfassung der Gesamtkeimzahl ölabbauender Mikroorganismen in Flüssigkultur mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie	87
3.4.3.	Überprüfung der Eignung eines Lösungsmittels zur Trennung von Öl aus wässriger bzw. wässriger mikroorganismenhaltiger Suspension und Biotrockenmassebestimmung (BTM)	89
3.4.4.	Analyse möglicher Einflüsse von Tetrachlorkohlenstoff auf die Gesamtkeimzahlbestimmung in ölhaltigen Medien	94
3.4.5.	Statistische Analytik des Einflusses von Tetrachlorkohlenstoff auf die turbidimetrische bzw. mikroskopische (Zählkammer) Bestimmung von Mikroorganismen in ölhaltigen Medien	102
3.4.6.	Wachstumsversuche zur Entwicklung einer Methode zur Erfassung ölabbauender Mikroorganismen mit Einsatz von Tetrachlorkohlenstoff zur Abtrennung des Öls	118
4.	<u>Diskussion</u>	134
4.1.	Diskussion der Freiland- und Laboruntersuchungen zum mikrobiellen Kohlenwasserstoffabbau in Wattsedimenten	134
4.2.	Diskussion des Keimzahlbestimmungsverfahrens für ölabbauende Mikroorganismen unter besonderer Berücksichtigung von Sedimenten ..	161

5.	<u>Zusammenfassung</u>	175
6.	<u>Anhang</u>	178
6.1.	Verwendete Bezeichnungen der angewandten Statistik	178
7.	<u>Literaturverzeichnis</u>	180
8.	<u>Schriftenverzeichnis</u>	189



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546312_0009

1. Einleitung

Das niederländisch-deutsch-dänische Wattenmeer ist eine der letzten großen Naturlandschaften Mitteleuropas. Durch seinen Arten- und Individuenreichtum bildet es einen einzigartigen und unschätzbaren Lebensraum für viele Tierarten. Die zunehmende Nutzung der Nordsee und somit auch des Wattenmeeres als Verkehrsträger, Rohstoffquelle, Vorfluter, durch Fischwirtschaft und Fremdenverkehr, birgt - besonders in den letzten Jahren deutlich geworden - große Gefahren für den Erhalt und Schutz des Wattenmeeres.

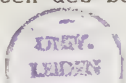
Der Eintrag chemischer Substanzen stellt eine ständige Gefährdung für den Fortbestand dieser Naturlandschaft dar. Dabei ist neben der Organohalogen- und Schwermetallbelastung die Ölverschmutzung eine der größten Bedrohungen des Ökosystems Wattenmeer (Martin & Walter, 1984). Tankerunfälle wie Torrey Canyon (Cornwall, England, 1967), Amoco Cadiz (Bretagne, Frankreich, 1978) oder Al Funtas an der Wilhelmshavener Ölpier (BRD, 1974) stellen zwar mit 5 % (v/v) Kohlenwasserstoffeintrag ins Meer (durchschnittliche Jahresmenge weltweit berechnet) nur einen vergleichsweise geringen Prozentsatz dar, haben aber verheerende Folgen für das betroffene Biotop (Gunkel, 1968a; Gerlach, 1976; Gassmann & Gunkel, 1983; Gundlach et al., 1983; Gunkel & Minas, 1985). Im Bereich des Wattenmeeres ergeben sich durch das Eindringen des Öls in das Sediment aufgrund der Sedimenteigenschaften und des Tidenwechsels besondere Probleme. Der Niedersächsische Arbeitsausschuß (1980) beschreibt in seinen Untersuchungen, daß nach einem Tankerunfall in der deutschen Bucht "durch das Rückdriften des Öls in der Ebbe-Phase dünne Schichten abgelagerten Öls im Watt" zu erwarten sind. Breuel (1981) nimmt an, daß in einem solchen Fall großflächig Öl im gesamten Bereich zwischen der Niedrig- und Hochwasserlinie abgelagert wird. Von diesen Annahmen ausgehend, wurde für die Untersuchungen dieser Arbeit, die im Rahmen interdisziplinärer Zu-

sammenarbeit mehrerer Autoren erstellt wurden (s. Höpner et al., 1985a), folgendes Szenario zugrunde gelegt: Nach einem Ölunfall ist mit einer großflächigen, jedoch dünnsschichtigen Ölkontamination auf den Wattflächen zu rechnen. Eine mechanische Beseitigung des Öls bzw. des ölhaltigen Sediments ist daher und aufgrund der schweren Begehrbarkeit des Wattsediments kaum möglich; dieses gilt insbesondere für weiche Schlicksedimente. Mit dem Ziel der Empfehlung zu Ölbekämpfungsmaßnahmen für diese besondere Situation fanden in unserer Arbeit Freilanduntersuchungen im Vareler Watt (Jadebusen) sowie Laboruntersuchungen statt.

Entsprechend des beschriebenen Szenarios - einer Ölkontamination im Watt - kommt den Mikroorganismen und ihren physiologischen Fähigkeiten hinsichtlich des Ölabbaus eine überragende Rolle zu (ZoBell, 1969; Johnston, 1970; Ahearn & Meyers, 1973; ZoBell, 1973; Walker et al., 1975; Gerlach, 1976; Atlas, 1977; Colwell, 1977; Walker & Colwell, 1977; Gusev & Koronelli, 1982; Gundlach et al., 1983; Floodgate, 1984; Gunkel & Minas, 1985). Wird ein Ökosystem mit Öl verseucht, resultiert daraus zumeist eine Veränderung der vorhandenen Mikroorganismen-Population, sowohl in der Konzentration als auch in der Zusammensetzung. Der Grad und die Dauer dieser Änderung ist eine Funktion der chemischen Zusammensetzung der verunreinigenden Kohlenwasserstoffe, ihrer Konzentration und des vorliegenden Biotops (Pfaender & Buckley, 1984). Die selektive Zunahme der ölabbauenden Mikroorganismen wird durch den Anstieg öltoleranter Mikroorganismen begleitet, die in einer "Sekundär-Stimulierung" die von den ölabbauenden Mikroorganismen produzierten Metabolite nutzen können (Bartha & Atlas, 1977). Für viele Arten innerhalb der Population bzw. in manchen Fällen sogar für die Gesamtpopulation kann die Kohlenwasserstoffzufuhr toxisch wirken. Ölkomponten wie z.B. Phenol, Toluol oder Cyclohexan können, wenn sie in höheren Konzentrationen vorliegen, bakteriostatisch

bzw. bakteriozid wirken (Perry, 1984). Auch können erst im Verlauf der Öloxidation Verbindungen höherer Toxizität entstehen, wie z.B. durch aromatische Kohlenwasserstoffe oder Fettsäuren, die giftiger wirken als die Ausgangssubstanz (Gunkel, 1987; Perry, 1984). Für alle öltoxischen Komponenten gilt, daß ihre Wirkung abhängig ist von ihrer vorliegenden Konzentration. In niedrigen Konzentrationen können sie aber u.U. sogar Wachstumssubstrat für einige Arten sein (Phenol, Toluol; Bartha & Atlas, 1977).

Die toxische Wirkung von Ölkomponenten auf Mikroorganismen beruht auf unterschiedlichen Mechanismen. Kurzkettige n-Alkane ($< C_9$) wirken bakteriozid aufgrund ihrer Fähigkeit, die Lipidmembranen der Zellen anzugreifen. Kohlenwasserstoffe mit der Kettenlänge C_5-C_8 inhibieren Transportfunktionen der Membranen, wie z.B. den Phosphat-Transport (Perry, 1984) oder die Glucose-Aufnahme (Ratledge, 1978), indem die Alkane sich an zellmembran-gebundene Proteine anlagern (Teh & Lee, 1974; Teh, 1974). Als subletaler Effekt der Kohlenwasserstoffwirkung wird u.a. die Hemmung der Chemotaxis beschrieben. Dabei ist die Auffindung von Nahrungsquellen durch die Blockade der Chemorezeptoren unterbunden (Bartha & Atlas, 1977). Dies ist allerdings bei fallender Konzentration der entsprechenden Ölkomponenten ein reversibler Prozeß (Chet & Mitchell, 1976). Bei der Wirkung der Öltoxizität darf nicht unberücksichtigt bleiben, daß im Freiland abiotische Faktoren, wie z.B. Temperatur, die Giftwirkung beeinflussen. So sinkt z.B. die Evaporation toxischer Komponenten bei fallenden Temperaturen (Gerlach, 1976). Das komplexe Zusammenspiel abiotischer Milieufaktoren wie z.B. Sauerstoff, Nährstoffe, Temperatur, Salinität der Umgebung, beeinflußt die Vermehrung der Mikroorganismen und deren enzymatische Aktivitäten und wirkt sich somit auch auf die Geschwindigkeit des Ölabbaus aus. Zudem ist die Verweildauer der Kohlenwasserstoffe abhängig von der Menge und Qualität der ölzusammensetzung sowie von den ökosystemspezifischen Gegebenheiten des betroffenen Biotops.



Dieselbe Ölmenge und -zusammensetzung wird in einem Ökosystem extrem langsam, in anderen innerhalb von Stunden oder Tagen abgebaut (Atlas, 1981). In einem Biotop, wie die von uns untersuchten Wattflächen, ist insbesondere nach dem Eindringen des Öls in das Sediment mit einer langen Verweildauer zu rechnen (Gassmann & Gunkel, 1983). Daher ist es für dieses Biotop ökologisch besonders wichtig, die Ölelimination zu fördern.

In den Freilanduntersuchungen des Vareler Watts wurden die abiotischen Faktoren geprüft, durch die die Ölabbau-geschwindigkeit beschleunigt werden könnte. Zunächst wurde die Frage der Versorgung mit Nährstoffen, womit in unserer Arbeit ausschließlich Stickstoff (N) und Phosphat (P) gemeint sind, untersucht. In der Literatur gab es Hinweise, daß die Zugabe von Nährstoffen bei Ölabbauenden Bakterien im Meerwasser eine Steigerung der Gesamtkeimzahlen sowie der Ölabbaurate bewirkte (Gunkel, 1967). Atlas und Bartha (1972) zeigten, daß niedrige Konzentrationen von Nährsalzen im natürlichen Seewasser die limitierenden Parameter für den Ölabbau sind. In ihren Versuchen konnte durch Zugabe von Stickstoff- und Phosphatsalzen der mikrobiologische Ölabbau von 3 % auf 70 % gesteigert werden. Entsprechende Untersuchungen für Schlickwattsedimente existierten nicht.

Die Nährstoffversorgung der Wattoberfläche findet hauptsächlich durch das dem Tidenwechsel unterworfenene Meerwasser statt. Da das Sediment nach einem Ölunfall durch den sich ablagernden und eindringenden Ölfilm von dieser Versorgung regelrecht abgeschirmt wird, lag die Vermutung nahe, daß das Einsetzen des mikrobiellen Ölabbaus rasch zu einer Verarmung der Nährstoffe und damit zur Limitierung des mikrobiellen Ölabbaus führt (Höpner et al., 1987). Diese These wurde bei den Freilandarbeiten anhand von Verölungssimulation untersucht.

Wie alle ökologischen Untersuchungen zeigten die im vorhergehenden Abschnitt angesprochenen Freilandexperimente die Problematik der Störanfälligkeit der Messungen, insbesondere aufgrund nicht exakt definierbarer Einflüsse biotischer und abiotischer Faktoren. Es wirkten sich u.a. jahreszeitlich bedingte Schwankungen der Temperatur oder der Nährstoffversorgung sowie Sedimentumlagerungen oder Bioturbation in einem nicht genau festlegbaren Ausmaß auf die Resultate aus. Dennoch waren diese Feldexperimente unerlässlich, um Daten über den Einfluß und das Verhalten von Ölkontaminationen im Schlickwatt sowie über die mögliche Förderung des biologischen Ölabbau unter natürlichen Umweltbedingungen zu erhalten. Diese Daten sollten durch entsprechende Laborexperimente ergänzt werden. Der Vorteil von Laborstudien ist die bessere Reproduzierbarkeit aufgrund konstanter und definierter Bedingungen während der Versuchsläufe. Auch können Einflüsse von Faktoren, wie z.B. die Sauerstoffversorgung auf den Ölabbau im Schlicksediment studiert werden, deren Simulation im Freiland nicht möglich, bzw. die Parameter schwer konstant zu halten wären.

Im Gegensatz zu den Freilandarbeiten wurde in den Laborexperimenten im "geschlossenen" System und unter aeroben Bedingungen gearbeitet. Wie die Freilandexperimente gezeigt hatten, war die Sauerstoffversorgung im Sediment unter natürlichen Bedingungen der limitierende Faktor für den durch Mikroorganismen bewirkten Kohlenwasserstoffabbau. So war es von Interesse, nach Aufhebung der Sauerstofflimitierung weitere abiotische, den mikrobiellen Ölabbau begrenzende Faktoren zu ermitteln. Naheliegend war, daß hierzu als erstes die Frage der Nährstoffversorgung untersucht wurde (s. Höpner et al., 1987).

Die in den Laboruntersuchungen durchgeführten Messungen der Kohlenwasserstoff-Abbauraten (IR-Analytik) in dem im Vergleich zu Feldversuchen vereinfachten, standardisierten

und geschlossenen Kultursystem sollte die Unterscheidung zwischen "echtem" mikrobiologischen Kohlenwasserstoffabbau und Vorgängen im Freiland, wie Evaporation oder Verdriftung ermöglichen. Die Ermittlung dieser mikrobiologischen Abbauraten sollten als "Faustformelwerte" den Zeitbedarf der Regeneration des Ökosystems nach einem Ölunfall abschätzen helfen.

Für das System Wasser gibt es in der Literatur bereits viele, für unterschiedliche Bedingungen ermittelte "mikrobielle Kohlenwasserstoff-Abbauraten" (ZoBell, 1964; Gibbs, 1975; Gibbs et al., 1975; Gunkel & Minas, 1985). Vergleichbare Daten für marine Sedimente liegen hingegen kaum vor (s. Tab. 1). Zudem besteht die generelle Problematik, bereits vorhandene Ölabbauraten in der Literatur zu vergleichen bzw. zu übertragen. Unterschiedliche Meßtechniken - manche Autoren nehmen das Volumen, andere die Oberfläche des Mediums als Basis -, sowie die diversen Wasser- und Sedimentunterschiede, Umweltbedingungen und nicht zuletzt die Quantität und Qualität des kontaminierenden Öls machen Vergleiche schwierig (s. Tab. 1). Daher bestand im Hinblick auf Empfehlungen zu Ölbekämpfungsmaßnahmen die Notwendigkeit, solche mikrobiellen Kohlenwasserstoff-Abbauraten auch für das von uns untersuchte Ökosystem Watt zu erstellen.

Tab. 1: Kohlenwasserstoffabbauraten aus der Literatur

System	Öl-Abbauraten	Quellennachweis
<u>1. Seewasser</u>		
Russ. und amerik. Rohöl in Mineral-salzlösung in Flaschen, 24-28 °C	750 mg/m ³ /Tag	ZoBell, 1964
dieselben Bedingungen wie oben, verschiedene Rohöle	30-500 mg/m ³ /Tag	wie oben
Öl-Wasser-Gemisch, nach 2 Tagen gemessen, 15 °C	320 mg/m ³ /Tag	wie oben
dieselben Bedingungen wie oben, 5 °C	< 100 mg/m ³ /Tag	wie oben
Öl-Seewasser-Emulsion	100-960 mg/m ³ /Tag	wie oben
an der Seewasseroberfläche treibendes Öl, völlig aerobe Bedingungen	500 mg/m ³ /Tag	Pilpel, 1968 in Johnston, 1970
Seewasser	ca. 82 mg/m ³ /Tag	Gibbs und Gibbs et al., 1975
Seewasser	1000 mg/m ³ /Tag 200 mg/m ³ /Tag	Gerlach, 1976
Seewasserpopulation mit Nährstoffzusatz	5-2500 mg/m ³ /Tag	Gunkel & Minas, 1985
"in situ"-Abbau, verunreinigte Fläche - Langzeitmessung	0,5-60 mg/m ³ /Tag	wie oben
"in situ"-Abbau, nicht verunreinigte Fläche - Kurzzeitmessung	0,001-0,03 mg/m ³ /Tag	wie oben
reines Seewasser, Abbau von Bunker C-öl, 4 °C	1,4 mg/m ³ /Tag	Gunkel & Minas, 1985
dieselben Bedingungen wie oben, 18 °C	5,2 mg/m ³ /Tag	wie oben
<u>2. Bodenbakterien in Seewasser</u>		
Russisches Rohöl	750 mg/m ³ /Tag	Sohnngen, 1913 in ZoBell, 1949
Hart-Paraffin	1930 mg/m ³ /Tag	Tausson, 1928 in ZoBell, 1949
Naphthalin	3370 mg/m ³ /Tag	wie oben
Rohöl	400-1200 mg/m ³ /Tag	Tausson & Shapiro, 1932 in ZoBell, 1949
Wattbodenbakterien in Seewasser (Flaschen), Louisiana Rohöl, 27 °C	560 mg/m ³ /Tag	ZoBell, 1949
<u>3. Sediment</u>		
leicht verölter Sand (z.B. 12 g Rohöl/m ²)	40 mg/m ³ /Tag	Johnston, 1970
stark verölter Sand (z.B. 1,1 kg Rohöl/m ²)	90 mg/m ³ /Tag	wie oben
Amoco Cadiz-Unfall breton. Küste	50 mg/m ³ /Tag	Gundlach et al., 1983

Um diese Abbauraten für Sedimente parallel mit den dazu stattfindenden mikrobiologischen Untersuchungen experimentell zu ermitteln, wurde in den Laboruntersuchungen mit zwei marinen Sedimenten gearbeitet: feinkörniges Schlickwatt (Vareler Watt, s. Tab. 2) und als Vergleich grobkörnigeres Sandwatt (Crildumersieler Watt, s. Tab. 4). In den Laborexperimenten wurden als Kohlenwasserstoffe Statfjordöl - wie bereits bei den Freilanduntersuchungen - und als "Modellkohlenwasserstoff" Hexadecan eingesetzt. N-Alkane mit der Kettenlänge C_{10} - C_{25} , zu denen auch Hexadecan gehört, zählen zu den am besten mikrobiologisch abbaubaren Kohlenwasserstoffen (Bartha & Atlas, 1977). Zwar ist in der Realität keine Kontaminationsgefahr durch Hexadecan zu erwarten, jedoch werden - im Gegensatz zum aus über 200 Einzelsubstanzen bestehenden Rohöl - ein schnellerer Abbau sowie klarere Versuchsergebnisse von einem definierten Kohlenwasserstoff erwartet (Kant et al., 1985).

Im Rahmen von Ölbekämpfungsmaßnahmen ist der Einsatz von Dispergatoren geplant. Die Verwendung von Dispergatoren auf Wattflächen soll zum einen die Elimination von Ölen aus dem Sediment bewirken, zum anderen, aufgrund der Bildung von Mikrotröpfchen und der damit verbundenen Entstehung größerer Oberflächen, die eine bessere mikrobielle Angreifbarkeit ermöglichen, eine Beschleunigung des Ölabbaus (Atlas & Bartha, 1973; Gerlach, 1976; Farke, 1984; Höpner et al., 1987).

Auf dem Markt existieren eine Vielzahl von Dispergatoren für den Einsatz in unterschiedlichsten Anwendungsgebieten. Die vorhandenen Informationen über Einsatzbereiche, Auswirkungen und optimale Dosierung sind u.a. aufgrund der vielfältig möglichen Anwendungssituationen nicht ausreichend. Dieses gilt besonders für Wattflächen. Durch potentiell toxische Konzentrationen des Dispergators bzw. des Öl-Dispergator-Gemisches können schwerere Schädigungen

des Ökosystems und somit auch an den öloxidierenden Mikroorganismen entstehen als durch eine Ölverunreinigung per se (Gunkel, 1972). Bei ungeeignetem Dispergatoreinsatz kann die mikrobielle Aktivität z.B. durch Veränderung der Permeabilität der Cytoplasmamembran, irreversible Denaturierung essentieller Enzyme, oder auch durch zu starke Reduzierung der Oberflächenspannung des Mediums gehemmt werden (Perry, 1984). Ölabbauende Mikroorganismen sind generell am aktivsten in Medien mit einer Oberflächenspannung von $0,045-0,06 \text{ Nm}^{-1}$. Eine Oberflächenspannung kleiner als $0,045 \text{ Nm}^{-1}$ wirkt sich hemmend aus, bei $0,025-0,035 \text{ Nm}^{-1}$ ergibt sich ein letaler Effekt (ZoBell, 1969). Viele Alkane werden aber erst bei einer Herabsetzung der Oberflächenspannung auf etwa $0,04 \text{ Nm}^{-1}$ dispergiert (ZoBell, 1969). Diese engen Grenzen zeigen u.a. die Problematik beim Dispergatoreinsatz auf. Auch hat der Eintrag von Dispergatoren einen zusätzlichen Sauerstoffverbrauch zur Folge; daher ist der Einsatz besonders in sauerstofflimitierten Sedimenten, wie dem Schlickwatt, fraglich (Gunkel, 1972). Unterbleibt der Dispergatoreinsatz, kann Öl durch physikalische Faktoren, wie Wind, Wellenschlag oder aber durch die von den ölabbauenden Mikroorganismen selbst gebildeten Emulgatoren dispergiert werden. Diese biogenen Emulgatoren und eventuell der Einsatz künstlicher Dispergatoren sind besonders in Gebieten mit geringer Mischungsenergie - zu denen auch das Wattengebiet zählt - von Bedeutung. Ölverunreinigungen in hochturbulenten Meeresgebieten werden dagegen vollständig ohne Dispergatoreinsatz innerhalb von wenigen Tagen dispergiert (van der Linden, 1978).

Da der Einsatz von Dispergatoren im Wattengebiet also eine sinnvolle Maßnahme sein könnte, wurde eine Auswahl von Dispergatoren hinsichtlich der Steigerung der mikrobiologischen Abbauraten sowie der Wirkung auf die Mikroorganismen einer Effektivitätsprüfung unterzogen. Diese Untersuchungen wurden sowohl im Freiland als auch im Labor

durchgeführt. Die getesteten Dispergatoren wurden nach folgenden Gesichtspunkten ausgewählt: Corexit 9527 wird zur Ölunfallbekämpfung seit Jahren bevorratet; sein Einsatz ist also wahrscheinlich; Metryl OD als Vertreter eines wirksamen Dispergators mit sehr niedriger Toxizität und THL als Vertreter eines hochaktiven Bio-Dispergators (Höpner et al., 1985b).

Eine weitere Maßnahme hinsichtlich Ölbekämpfungsstrategien wird bereits seit längerer Zeit diskutiert. Sie sieht das "Aussäen" öloxidierender Mikroorganismen bei einem Ölunfall vor. Mit der Auswahl besonders aktiver Stämme, mit der massiven Beimpfung einer großen Zahl von Mikroorganismen, die die lag-Phase verkürzen sollte, und mit der Steuerung von Umweltbedingungen wie z.B. Nährstoffzugaben waren in biotechnologischen Versuchen hier Erfolge erzielt worden (Gunkel, 1984). Atlas (1977) schränkte die Anwendung dieser Methode auf spezielle Ölverunreinigungssituationen ein. Tagger et al. (1983) und Gunkel (1984) lehnten hingegen die Anwendung einer solchen Technik ab. Beide Autoren kamen zu der Ansicht, daß der Ölabbau vor allem durch abiotische Faktoren, die das Wachstum der Mikroorganismen bestimmen, limitiert wird. Zudem wurden die künstlich "ausgesäten" allochthonen öloxidierenden Mikroorganismen rasch durch die autochthonen Populationen überwachsen, da diese hinsichtlich der Anpassung an das betreffende Biotop stets den artifiziell ausgebrachten Mikroorganismen überlegen waren. Da kein Mikroorganismus existiert, der in der Lage ist, sämtliche Kohlenwasserstoffe zu oxidieren, müßte eine künstliche Population aus verschiedenen Stämmen so zusammengestellt sein, daß alle Komponenten bzw. Abbauprodukte des Öls angegriffen werden können. Unter Umständen wäre ein wiederholtes "Aussäen" verschiedener Mikroorganismen-Stämme je nach Progression des Abbaus nötig. Zusätzlich kommen bei der Zusammenstellung solcher Populationen für das Freiland noch Probleme der Lagerfähigkeit und Pathogenität hinzu (Gunkel, 1984).

In den durchgeführten Untersuchungen von Tagger et al. (1983) und Gunkel (1984) konnte in keinem Fall die Ölabbaugeschwindigkeit durch "Aussäen" von Mikroorganismen beschleunigt werden. Um einen Beitrag zu dieser Diskussion zu liefern, wurde, obwohl mit dieser Methode im Freiland bislang kaum Erfolge erzielt werden konnten, in unserer Arbeit im Laborversuch erneut untersucht, ob damit die mikrobiellen Ölabbauraten prinzipiell zu steigern sind.

Während der Freiland- und Laboruntersuchungen fanden die mikrobiologischen Bestimmungen anhand der Erfassung von Lebendkeimzahlen (TCFU) auf Hefeextrakt-Seewasser-Agarplatten statt. Diese Lebendkeimzahlbestimmungen spiegeln die Auswirkungen der getesteten Parameter- u.a. auf Möglichkeiten der Lebendkeimzahlstimulierung mit verbundener Erhöhung der Ölabbauraten oder u.U. toxische Wirkungen auf die Mikroorganismen - wider (s. Kap. 4.1.). Für eine exakte Kalkulation des mikrobiologischen Ölabbbaus ist die Kenntnis der Anzahl Ölabbauender Organismen an der Gesamtpopulation unerlässlich. Die Bestimmung dieser Ölabbauerkkeimzahlen wurden in dieser Arbeit nach herkömmlicher Methode (Lebendkeimzahlbestimmung ölabbauender Mikroorganismen nach Krumbein et al., 1980) durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, daß diese Methode für Sedimentproben ungeeignet war (s. Kap. 4.2.). Aus dieser Situation entstand der Bedarf nach einem hierfür geeigneten Ölabbauer-Testsystem. Im letzten Teil dieser Arbeit wurde daher ein qualitatives Keimzahlbestimmungsverfahren für ölabbauende Mikroorganismen entwickelt.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Standardchemikalien (Fa. Merck, Darmstadt). Magnesiumammoniumphosphat (Chemische Fabrik, Budenheim). Mikrobiologische Substanzen (Fa. Merck, Darmstadt): Acridinorange (für die Mikrobiologie $\hat{=}$ f.d.M.), Agar-Agar (DAB 6), Fleischextrakt (f.d.M.), D(+) Glucose-Monohydrat (für biochemische und mikrobiologische Zwecke), Hefeextrakt (f.d.M.), Malzextrakt, Pepton aus Casein (tryptisch verdaut, f.d.M.). Emulgatoren: TWEEN 80 (Fa. Serva, Heidelberg), TM Hüls (mit besonderem Dank für die Überlassung von Dr. W. Gunkel, Biologische Anstalt, Helgoland). Dispergatoren: Corexit 9527 (Esso AG, Hamburg), Metryl OD (Raab Karcher, Hamburg), THL (Prof. Dr. F. Wagner, Braunschweig-Stöckheim). Rohöle: Arabian light (NWO, Wilhelmshaven) für die Versuche von Kap. 3.1. und 3.4. (bis 3.4.5. einschließlich), Statfjord-Öl (Dank für die Bereitstellung der Fa. Esso AG, Hamburg) für die Versuche der Kap. 3.1., 3.2., 3.4. (ab 3.4.5.), verwendet als abgetoppte Rohöle durch Erhitzung auf max. 90 °C (bis ca. 20-25 % Gewichtsverlust und Verdunstung der leichtflüchtigen und hochtoxischen Bestandteile).

2.2. Organismen

Folgende Bakterienstämme wurden verwendet: *Bacillus coagulans* (DSM Nr. 1), *Bacillus subtilis* (DSM Nr. 10), *Escherichia coli* (DSM Nr. 30083), *Pseudomonas aeruginosa* (DSM Nr. 50071) und *Saccharomyces* 2200 (E.R. Lochmann, Institut für Molekulare Biologie und Biochemie, FB Biologie, FU Berlin). Zusätzlich wurden "Wattmischpopulationen" verwendet, die aerob kultiviert wurden (s. Abschnitt 2.4.2.). Ihre Populationszusammensetzung stand in Abhängigkeit vom Probenahmeort.

2.3. Medien und Lösungen

Das Hefevollmedium (HVM) nach DSM Nr. 186 (modifiziert) enthielt 20 g D(+) Glucose-Monohydrat, 5 g Hefeextrakt, 10 g Pepton aus Casein, 1000 ml Aqua dest.. Das M₁-Medium nach Krumbein et al. (1980) enthielt 1,0 g Hefeextrakt, 750 ml natürliches Seewasser, 250 ml Aqua dest. Das M₂-Medium nach Krumbein et al. (1980) enthielt 0,41 g K₂HPO₄, 0,66 g KH₂PO₄, 0,002 g MnCl₂ x 4 H₂O, 1,0 g (NH₄)₂SO₄, 0,1 g MgCl₂ x 6 H₂O, 0,05 g FeCl₂ x 4 H₂O, 750 ml natürliches Seewasser, 250 ml Aqua dest., 10 ml Rohöl. Aus dem M₁- bzw. M₂-Medium ergibt sich das M₁K- bzw. M₂K-Medium durch Verwendung künstlichen Seewassers¹⁾, das M₂K-E-Medium durch Zugabe von 1 % TM Hüls. Das Nutrient Medium (NM) nach DSM Nr. 1 enthielt 5 g Pepton, 3 g Fleischextrakt, 1000 ml Aqua dest. und wurde auf pH 7,0 eingestellt. Hieraus ergibt sich das Nutrient-S-Medium (NSM) durch Verwendung künstlichen Seewassers. Bei Herstellung von Agarplatten bzw. Schrägagar-Röhrchen wurde den Medien 20 g Agar ad 1 l Medium zugegeben. Das Seewasser SV-Medium (SSVM) enthielt 1000 ml künstliches Seewasser, 1 ml Spurenelementlösung, 3 ml Vitaminlösung.

Die Spurenelementlösung nach DSM, Medium 124, modifiziert, enthielt: 1500 mg FeCl₂ x 4 H₂O, 68 mg ZnCl₂, 100 mg MnCl₂ x 4 H₂O, 62 mg H₃BO₃, 120 mg CoCl₂ x 6 H₂O, 17 mg CuCl₂ x 2 H₂O, 24 mg NiCl₂ x 6 H₂O, 24 mg Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 1000 ml Aqua dest.

1) Für die Untersuchungen der Probenahmen 1 (22.2.1983) bis 7 (1.6.1983) der Felder 1.1. bis 1.5. (s. Kap. 2.8.) wurde gealtertes, natürliches Seewasser (Nordseewasser vor Mellum) 4:1 mit Aqua dest. verdünnt verwendet. Ab Probenahme 8 (30.6.1983) und für alle darauffolgenden Untersuchungen wurde künstliches Seewasser nach T. Levring (1946) verwendet.

Die Vitaminlösung für Boden- und Wasserbakterien nach Schlegel (1981) enthielt: 0,2 mg Biotin, 2,0 mg Nikotinsäure, 1,0 mg Thiamin, 1,0 mg 4-Aminobenzoat, 0,5 mg Pantothenat, 5,0 mg Pyridoxamin, 2,0 mg Cyanocobalamin, 100 ml Aqua dest.

Die physiologische Kochsalzlösung enthielt 0,9 % NaCl in Aqua dest.. Die Färbelösung (Acridinorange) für die Fluoreszenzmikroskopie wurde durch Lösen von Acridinorange in Aqua dest. hergestellt und für die Lebendfärbung in einer Konzentration von 100 ppm bzw. für hitzfixierte Präparate von 10 ppm verwendet.

2.4. Vorkulturen

2.4.1. Reine Stämme

Die Vorkulturen mit reinen Stämmen wurden mit 1-2 Impfösen des jeweiligen Stammes angeimpft und bei 90 rpm (Rundschüttler) inkubiert.

Bacillus coagulans: 30 ml NSM, Inkubation 24 h, 37 °C.

Bacillus subtilis: 150 ml NM, Inkubation 10 h, 30 °C.

Escherichia coli: 150 ml NSM, Inkubation 25 h, 30 °C.

Pseudomonas aeruginosa: 30 ml NSM, Inkubation 24 h, 37 °C.

Saccharomyces 2200: 50 ml HVM, Inkubation 20 h, 30 °C.

2.4.2. Wattmischpopulation

Wattmischpopulation (WAK I): 90 g frisches Schlickwatt (Vareler Watt) + 100 ml künstliches Seewasser, Inkubation: 70 h, 70 rpm, 30 °C (18 °C für Mikrotiterplattenversuche, s. 3.4.2.), dann Zusatz von 400 ml künstlichem Seewasser mit 0,5 % TWEEN 80, nach Durchmischung und Absetzen des Sediments Verwendung des mikroorganismenhaltigen Überstandes. Wattmischpopulation (WAK II): 90 g frisches Watt (Vareler bzw. Crildumersieler Watt) + 100 ml künstliches Seewasser, Inkubation: ca. 4 d, 30 °C, 70 rpm. Öladaptier-

te Wattmischpopulation zum Animpfen sterilen¹⁾ Watt-sediments (s. Abschnitt 3.2.): 50 g frisches Schlickwatt (Vareler Watt) + 200 g natürliches, gealtertes Seewasser + 1 % (v/w) Statfjordöl, Inkubation: 90 h, 18 °C, 70 rpm, dann Zusatz von 0,5 TWEEN 80 (Lösen der Mikroorganismen vom Sediment).

2.5. Methoden

2.5.1. Biotrockenmasse-Bestimmung (BTM)

Die Bakterienmasse in den Teströhrchen wurde sterilfiltriert (Sartorius-Membranfilter SM 130, Sartorius GmbH, Göttingen) und die zuvor ausgewogenen Sterilfilter mit der Biofeuchtmasse bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach Auskühlen im Exsikkator Ermittlung der BTM durch Auswiegen.

2.5.2. Kulturen zur Bestimmung des Kohlenwasserstoffabbaus in Wattsedimenten (s. Abschnitt 3.2.)

Die Versuchsansätze waren folgende:

Bei Schlickwattsedimenten²⁾ enthielten 250 ml Erlenmeyer-Kolben 50 g frisches bzw. sterilisiertes³⁾ Sediment (Trockengewicht), ca. 56 ml gealtertes, natürliches Seewasser (Nordseewasser vor Mellum), 500 µl Hexadecan bzw. Statfjordöl (390 bzw. 385 mg), 60 mg Stickstoff (als

1) Sterilisation: 30 min, 121 °C, 1 bar.

2) Das aerobe Sediment wurde unter sterilen Bedingungen von den unter Kap. 2.6. genannten Probenahmeorten entnommen.

3) Sterilisiertes Sediment (s. 2.4.2.) wurde mit einer Wattmischpopulation (s. 2.4.2. sowie 3.2.) beimpft.

NaNO_3), 6 mg Phosphat (als NaH_2PO_4), bei 100 μl Kohlenwasserstoffzugabe nur 12 mg N (als NaNO_3) und 1,2 mg P (als NaH_2PO_4). Das Kohlenwasserstoff-Nährstoffverhältnis wurde nach den Daten von Gibbs (1975) kalkuliert (Kant et al., 1985).

Bei Sandwattsedimenten¹⁾ wurde wie oben verfahren, jedoch wurden hier 60 g Sandwatt (Trockengewicht) mit 38 g Seewasser versetzt.

Der Wassergehalt dieser Sedimente war ausreichend, um bei einer Schüttelfrequenz von 200 rpm eine ständige Durchmischung des Sediments sowie aerobe Bedingungen im Kolben zu gewährleisten. Verschließen der Erlenmeyer-Kolben mit Aluminium-Folie. Inkubation: 40 d, 16 °C, im Dunkeln. Die Dispergatoren Corexit 9527 und Metryl OD wurden in 10 % (v/v), THL in 1 % (v/v) der Kohlenwasserstoffzugabe zugefügt (Kant et al., 1985).

Die natürlichen Nährstoffgehalte der verwendeten Sedimente wurden bestimmt (Kant et al., 1985). Sie lagen niedrig und betrugen beim Schlickwatt 2,0 mg Stickstoff und 0,05 mg Phosphor und beim Sandwatt 0,3 mg Stickstoff und 0,06 mg Phosphor pro 50 g Sediment (Inhalt der Erlenmeyer-Kolben).

2.5.3. Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskop

Einstellung des ZEISS-Fluoreszenzmikroskops, Oberkochem: Anregung 436 nm, Bandbreite 6 nm, Farbteiler 460 nm, Langpaß 470 nm.

1) Das aerobe Sediment wurde unter sterilen Bedingungen von den unter Kap. 2.6. genannten Probenahmeorten entnommen.

Fluoreszenzspektrum

Messung des Fluoreszenzspektrums: AMINCO-BOWMAN
Spektrophotofluorometer, American Instrument Company,
Silver Spring, Maryland.

Hitze-fixierte Präparate für die Fluoreszenzmikroskopie

Bacillus coagulans: Vorkultur: 4×10^7 N/ml, Färbung der
hitze-fixierten Präparate (Objektträger) 120 Sek. in 10 ppm
Acridinorange-Lösung, Spülen mit Aqua dest., Lufttrocknung
im Dunkeln.

Wattmischpopulation I: Ansatz 1 - ohne Ölzusatz:

Vorkultur und Färbung der hitze-fixierten Präparate s.o..

Ansatz 2 - mit Ölzusatz: 1 ml Vorkultur plus 4 ml M₂K-
Medium, Inkubation: 24 h, 30 °C, 90 rpm. Hitze-fixierung,
Färbung s.o..

Lebendfärbung von Bacillus coagulans für die Fluoreszenz- mikroskopie

10 ml Bacillus coagulans Vorkultur (Titer: 4×10^7 N/ml)
plus 15 ml Acridinorange-Lösung (100 ppm), Inkubation:
15 min im Dunkeln. Herstellung hitze-fixierter Präparate.

2.5.4. Keimzahlbestimmungen

Gesamtkeimzahlbestimmungen

Photometrische Trübungsmessung (Turbidimetrie)

Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm
(Perkin-Elmer Spektrophotometer 550S, Überlingen) gemessen
(Glasküvetten, Schichttiefe: 1 cm).

Zellzahlbestimmung mit der Zählkammer

Es wurde mit einer Bakterienzählkammer (Thoma, Schicht-
tiefe: 0,02 mm) gearbeitet.

Lebendkeimzahlbestimmungen

Lebendkeimzahlbestimmung (TCFU)¹⁾ nach Krumbein et al., 1980, modifiziert.

In ca. 2- bis 4-wöchigen Abständen (Freilanduntersuchungen) bzw. in 10-tägigen Abständen (Laboruntersuchungen) wurden ca. 10 g aerobes Sediment von den jeweiligen Watt-Testflächen (s. Abschnitt 3.1.) bzw. aus den Erlenmeyer-Kolben (s. Abschnitt 3.2.) mit Hilfe eines sterilen Spatels in sterile Proberöhrchen entnommen. Die Proben wurden sofort gekühlt und bis zur weiteren Verarbeitung kurzfristig bei 4 °C aufbewahrt bzw. bei einer größeren Anzahl Proben in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -20 °C gelagert.

Zur Aufarbeitung wurden 2 g des Wattsediments mit Seewasser im Verhältnis 1:3 (w/v) verdünnt und suspendiert. Diese Suspension wurde bei den Freilandproben 30 sec. bei 50 Hz mit Ultraschall (Branson-Sonifier B12A, Danbury, Connecticut) behandelt. Bei den Proben des Abschnitts 3.2. wurden die 2 g Wattsediment ebenfalls mit Seewasser im Verhältnis 1:3 (v/v) verdünnt, das hier jedoch 0,5 % (v/v) TWEEN 80 enthielt. Die Proben wurden 30-60 sec mit dem Whirl-mix durchmischt. Zweck der Ultraschall- bzw. TWEEN 80-Behandlung war, die Mikroorganismenaggregate zu zerteilen sowie die Mikroorganismen von den Schlickpartikeln abzulösen. Die experimentelle Überprüfung der Eignung von 0,5 % (v/v) TWEEN 80 ist in Abschnitt 3.3. nachzulesen. Nach Absetzen des Sediments wurden aus dem Überstand Verdünnungsreihen zwischen 10^{-1} und 10^{-4} mit Seewasser angesetzt. Ferner wurden ca. 6 g der Sedimentprobe für die Ermittlung des Trockengewichts bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Zur Keimzahlbestimmung wurden von den Verdünnungen jeweils 5 Parallelproben auf M_1 - bzw.

1) Total colony forming units

M₁K-Agar ausgespatelt. Inkubation: 21 d, 18 °C, im Dunkeln. Zur Auswertung kamen die Platten, die eine Kolonienzahl zwischen 50 und 500 aufwiesen. Die Keimzahlen (N) wurden für 1 g Sediment-Feucht- bzw. Trockengewicht berechnet.

Lebendkeimzahlbestimmung ölabbauender Mikroorganismen nach Krumbein et al., 1980, modifiziert

Die Proben wurden wie zur TCFU-Bestimmung aufgearbeitet. Die 10⁻⁶-verdünnte Bakteriensuspension wurde jedoch anstatt auf M₁- bzw. M₁K-Medium-Agarplatten auf M₂- bzw. M₂K-Medium-Agarplatten ausgespatelt. Die Inkubationsbedingungen sowie die Auswertung blieben wie bei der TCFU-Bestimmung.

2.5.5. Sedimentkernprobenahme und Flüssiginkubation

Sedimentkernprobenahmen des Abschnitts 3.1. fanden auf den in Abschnitt 2.6. beschriebenen Feldern statt. Am 13.03.1984 aus den Feldern 2.4. (Sand, Nährstoffe, Rohöl) und 2.5. (Sand, Rohöl). Hier wurden je Feld zwei Kerne entnommen. Außerdem am 17.12.1984 aus den Feldern 3.2. (Sand, Rohöl) und 3.3. (Sand, Rohöl, Corexit). Hier wurde je Feld lediglich ein Sedimentkern entnommen. Die Edelstahlrohre zur Probenahme hatte 30 cm Länge und 5 cm Durchmesser. Sie wurden ca. zur Hälfte senkrecht in den Wattboden geschoben, nach Lockern vom umgebenden Sediment entnommen und in sterile Pipettendosen gegeben. Eine Kühlung der Sedimentkerne fand aufgrund der Witterung lediglich am 13.03.1984 statt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert. Die Aufarbeitung der Kerne fand unter sterilen Bedingungen statt. Die angetauten Sedimentkerne wurden bis zu einer Tiefe von ca. 5 bzw. 8 cm in 0,5 bis 1,0 cm Abständen mit einem heizbaren Draht in Scheiben geschnitten und die Scheiben in Petrischalen liegend aufgetaut. Für die Lebendkeimzahlbestimmung wurden

ca. 2 g Wattsediment von der Oberfläche jeder Sedimentscheibe, wie unter Abschnitt 2.5.4. beschrieben, aufgearbeitet.

Flüssiginkubationen fanden für die Sedimentkernproben vom 13.03.1984 der Felder 2.4. und 2.5. statt. Für Feld 2.4. wurden die Schichten in 1,0; 1,5; 2,0 und 2,5 cm Tiefe, für Feld 2.5. die Oberflächenschicht sowie Schichten bis zur Öl-/Reduktionszone (1,0; 1,5; 2,0 und 2,5 cm Tiefe), erkennbar bei Zerteilung der Kerne, gewählt. Pro Schicht wurden drei parallele Inkubationskolben (30 ml) mit je 2 g Sediment und 6 ml künstlichem Seewasser im Verhältnis 1:3 (w/v) angesetzt. Inkubation: 21 d, 18 °C, 40 rpm, im Dunkeln. Anschließend wurden die Suspensionen 30 sec bei 50 Hz unter Kühlung homogenisiert, um die Bakterienaggregate zu zerschlagen und die Bakterien von den Schlickpartikeln abzutrennen. Nach Absetzen des Schlicks wurde pro Kolben 1 ml Überstand entnommen und die Lebendkeimzahlen (TCFU s. 2.5.4.) ermittelt. Der verbliebene Inhalt der Inkubationsfläschchen wurde mit M₂K-E-Medium im Verhältnis 1:3 (v/v) versetzt. Inkubation: 21 d, 18 °C, 40 rpm, im Dunkeln. Anschließend wurden die Suspensionen wiederum 30 sec bei 50 Hz (4 °C) homogenisiert. Nach Absetzen des Schlicks wurden im Überstand Lebendkeimzahlen (TCFU s. 2.5.4.) ermittelt und das Trockengewicht des Schlicks bestimmt (Kant & Michaelsen, 1985).

2.5.6. Qualitative Auswertung des Bakterienwachstums in Kulturröhrchen

In Anlehnung an das MPN-Verfahren¹⁾ von Gunkel & Trekel (1967) wurde den Teströhrchen vor der Bewertung je 8,3 % (v/v) 10%ige HClO₄ zugefügt, um eventuell vorhandene anorganische Trübungen zu lösen. Danach wurde entschieden, ob mikrobielles Wachstum per Medientrübung nachweisbar war.

1) Most probable number

2.6. Freilandarbeiten

2.6.1. Lage und sedimentologische Charakterisierung der Versuchsfelder sowie der Probenahmeorte für die Laborarbeiten

Die Versuchsfelder für die unter 3.1. beschriebenen Freilandarbeiten lagen im Vareler Watt des Jadebusens (südliche Nordsee). In der Übersichtskarte sind sie durch die Positionen 1, 2 und 3 markiert (s. Abb. 1). Die topographische Karte zeigt ihre genaue Lage (s. Abb. 2). Ergebnisse von Korngrößenanalysen des Untersuchungsbereichs wurden von Ragutzki (1983) übernommen.

Tab. 2: Korngrößenverteilung bei Pos. 1, 2 und 3 der Abb. 2 nach Ragutzki (1983)

Korngrößen	Anteil im Sediment
< 0,01 mm	15 %
0,01 - 0,06 mm	13 %
0,06 - 0,10 mm	52 %
0,10 - 0,20 mm	18 %
> 0,20 mm	2 %

In diesem Bereich wurden ebenfalls Schlicksedimentproben für die unter 3.2. beschriebenen Laborversuche entnommen (periodisch überfluteter Wattbereich).

Die Schlicksedimentproben des unter Abschnitt 3.2. beschriebenen aperiodisch überfluteten Wattbereiches stammen aus dem durch Position 4 in Abb. 1 und 2 markierten Bereich. Eine Korngrößencharakterisierung wurde hier wiederum von Ragutzki (1983) durchgeführt.

Tab. 3: Korngrößenverteilung bei Position 4 der Abb. 3 nach Ragutzki (1983)

Korngrößen	Anteil im Sediment
< 0,01 mm	13 %
0,01 - 0,06 mm	24 %
0,06 - 0,10 mm	49 %
0,10 - 0,20 mm	11 %
> 0,20 mm	3 %

Die Feinsandproben für die unter 3.2. durchgeführten Versuche stammten aus dem Crildumersielier Watt, nordwestlich von Wilhelmshaven, durch die Position 5 in Abb. 1 und 3 markiert. Eine Korngrößencharakterisierung (s. Tab. 4) führte hier Dörjes (1984) durch.

Tab. 4: Korngrößenverteilung bei Pos. 5 der Abb. 3 (Dörjes, 1984). In Klammern die Korngrößen in mm nach Ragutzki (1983), die den von Dörjes verwendeten Bezeichnungen zugeordnet sind.

Korngrößen	Anteil im Sediment
Ton-Schluff (< 0,01 mm)	1 %
Schluff (0,01 - 0,06 mm)	5,0 - 5,6 %
Feinsand (0,06 - 0,20 mm)	90,6 - 93,4 %
Mittelsand (> 0,20 mm)	0 - 4,4 %

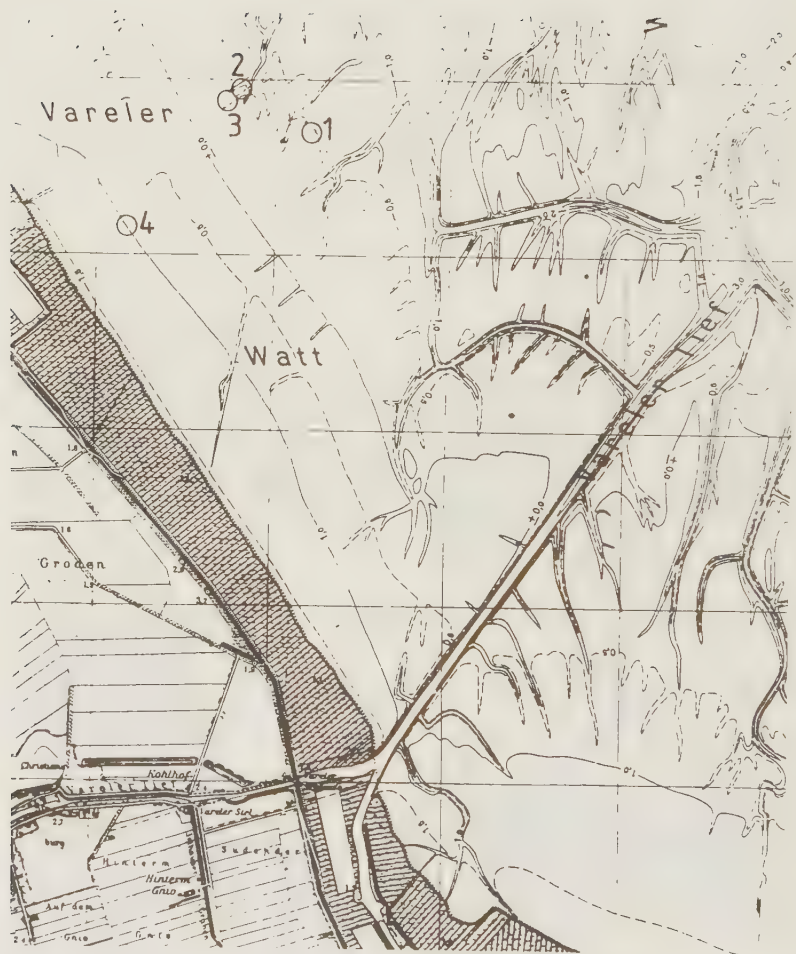


Abb. 2: Lage der Versuchsfelder sowie der Sedimentprobenahmeorte im Vareler Watt. Maßstab 1:25 000

werden) und im Hinblick auf Ölbekämpfungsmaßnahmen ohne Eignung für den Einsatz schwerer Geräte (s. Kap. 1. und Höpner et al., 1985a).

Die im Zeitraum der Jahre 1983 und 1984 angelegten Versuchsflächen trugen folgende Bezeichnung:

Felder 1.1. - 1.5.	Februar - Juni 1983
Felder 2.1. - 2.5.	August 1983 - April 1984
Felder 3.1. - 3.5.	Mai - Dezember 1984

Die in Abb. 2 für die Versuchsflächen markierte Position 1 steht für die Testflächen 1.1. - 1.5., Position 2 für 2.1. - 2.5. und Position 3 für 3.1. - 3.5..

Die Größe der einzelnen Felder der Versuchsflächen betrug bei den Flächen 1.1. - 1.5. je 4 m², bei den Flächen 2.1. - 2.5. je 16 m² und bei den Flächen 3.1. - 3.5. je 12 m². Die einzelnen Felder wurden, wie aus Tab. 5 zu entnehmen ist, behandelt. Die Felder 1.1., 2.1. und 3.1a waren unbehandelt und dienten daher als O-Kontrollen.

Um die Bearbeitung der Testflächen, wie in Tabelle 5 beschrieben, vornehmen zu können, wurden zwei unterschiedliche Techniken angewandt. Bei den Testflächen 1.1. - 1.5. (Febr. - Juni 1983) wurde das Sediment auf den Testflächen mittels normaler Schneeschieber ca. 3 - 5 cm abgenommen, die genannten Salze möglichst gleichmäßig eingestreut und das abgeräumte Sediment wieder auf die Versuchsflächen aufgebracht (s. Abb. 4 und 5).

Tab. 5: Bearbeitung der Versuchsflächen 1.1. - 1.5., 2.1. - 2.5. und 3.1. - 3.5. im Vareler Watt

Versuchs- flächen	1	2	3
Feld .1.	unbehandelt	unbehandelt	.1a unbehandelt .1b Sandauflage (10 kg/m ²)
Feld .2.	mechanisch bearbeitet	Sandauflage (10 kg/m ²)	Sandauflage (10 kg/m ²) + Öl (360 g/m ²)
Feld .3.	Harnstoff (1,5 mol/m ²)	wie Feld 2.2. + Magnesium- ammoniumphosphat (5 mol/m ²)	wie Feld 3.2. + Corexit 9527 (10 % w/w)
Feld .4.	Dinatrium- hydrogen- phosphat (0,4 mol/m ²)	wie Feld 2.3. + Öl (300 g/m ²)	wie Feld 3.2. + THL (1 % w/w)
Feld .5.	Harnstoff (s.o.) + Dinatrium- hydrogen- phosphat (s.o.) + Öl (300 g/m ²)	wie Feld 2.2. + Öl (300 g/m ²)	wie Feld 3.2. + Metryl OD (10 % w/w)



Abb. 4: Versuchsflächen 1.1. - 1.5., Vareler Watt. Probenahme vor Bearbeitung der Felder und Abräumen des Sediments mittels Schneeschieber.

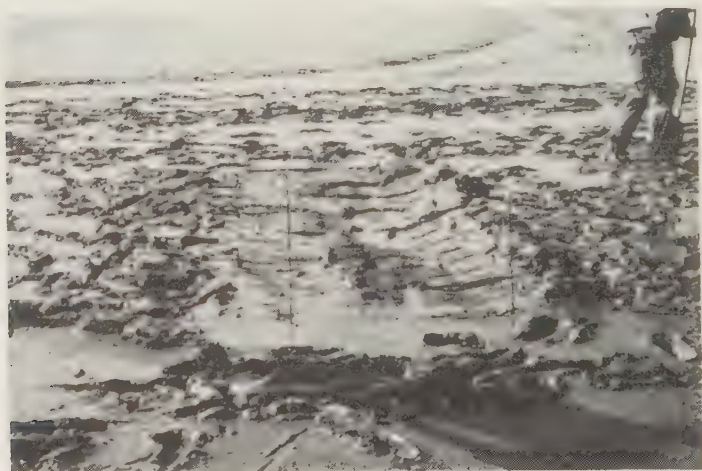


Abb. 5: Abgeräumtes und mit Eisenstangen markiertes Probefeld. Versuchsflächen 1.1. - 1.5., Vareler Watt.

Für die Testserien 2.1. - 2.5. (August 83 - April 84) und 3.1. - 3.5. (Mai - Dezember 84) wurde folgende, veränderte Technik für die Bearbeitung der Felder angewandt. Zunächst wurden in einer Zementmischmaschine Gemische aus Feinsand und den gewählten Zusätzen wie Nährstoffe, Öl oder Dispergatoren hergestellt. Diese Gemische wurden mittels einer speziell konstruierten Arbeitsbrücke und eines Rasendüngerstreuers bzw. Siebes gleichmäßig auf die Sedimentoberfläche verteilt, ohne sie vorher, wie bei den Feldern 1.1. - 1.5., abzuräumen (s. Abb. 6, 7 und 8). Die Arbeitsbrücke ermöglichte die Bearbeitung der Felder, ohne daß sie betreten werden mußten, womit die erhebliche Störung durch Begehen der Felder ausgeschlossen werden konnte.



Abb. 6: Testflächen 2.1. - 2.5. bzw. 3.1. - 3.5., Vareler Watt: Ausbringen der Testsubstanzen mittels einer Arbeitsbrücke und eines Rasendüngerstreuers.



Abb. 7: Testflächen 2.1. - 2.5. bzw. 3.1. - 3.5., Vareler Watt: Ausbringen der Testsubstanzen mittels Arbeitsbrücke und Sieb.



Abb. 8: Testflächen 2.1. - 2.5. bzw. 3.1. - 3.5., Vareler Watt: Bearbeitete Testflächen. Die unterschiedliche Färbung des Sandes ist auf die verschiedenen Zusatzsubstanzen zurückzuführen. Im Vordergrund zwei Testflächen mit Ölzusatz zum Sand.

Mit dieser beschriebenen Technik wurde auch die bei den Versuchsflächen 2.1. - 2.5. erstmals auftretende Notwendigkeit der Flächenausbringung von Rohöl gelöst. Ein Auftrag von flüssigem Rohöl auf die Sedimentflächen war nach den Erfahrungen von Dörjes (1984) schwierig. Rohöl ließ sich nur sehr ungleichmäßig auf der Sedimentoberfläche verteilen; zudem bestand stets die Gefahr der Ver-

driftung durch die nächste Tide. Wie Abb. 9 zeigt, bleibt das Rohöl-Sand-Gemisch auch bei eintretender Flut auf der Sedimentoberfläche liegen. Verdriftungen konnten nicht beobachtet werden. Die Sandgemische überschlickten rasch, innerhalb von 24 Stunden nach der Bearbeitung, um ca. 1 mm.

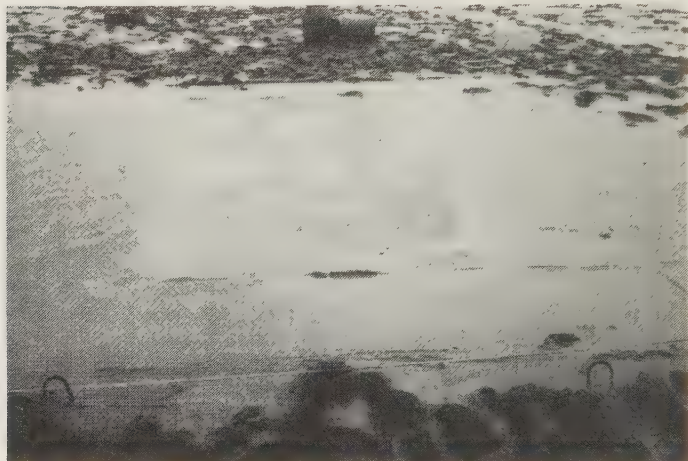


Abb. 9: Einsetzende Überflutung der Testflächen 2.1. - 2.5. bzw. 3.1. - 3.5., Vareler Watt. Die Sandgemische bleiben auf der Sedimentoberfläche fixiert.

Die verwendeten Rohöle waren Arabian light bei der Testserie 2.1. - 2.5. und Statfjordöl bei der Testserie 3.1. - 3.5.. Die Auswahl der Rohölsorten erfolgte entsprechend der zum jeweiligen Zeitpunkt hauptsächlich gehandelten Ölsorten am norddeutschen Rohölmarkt. Sie wurden als frische, ungealterte Rohöle in 3,6 % (w/w) dem Sand zugegeben, womit noch eine streufähige Mischung vorlag. Ziel war, eine ölkonzentration von 360 g pro m² zu erreichen - das entspricht einer dünn-schichtigen Verölung - und wurde mit dem Ausstreuen von 10 kg veröltem Sand pro m² erzielt (s. Tab. 5).

3. Ergebnisse

Für die Abbildungen der Abschnitte 3.1. und 3.2. gilt, daß die Größe der eingezeichneten Punkte die Konfidenzintervalle, bezogen auf das jeweilige arithmetische Mittel, für 95 % statistische Sicherheit wiedergibt.

3.1. Freilanduntersuchungen zum mikrobiellen Kohlenwasserstoffabbau in Wattsedimenten

Wie in der Einleitung (s. Kap. 1) dargestellt, sollte die Frage geprüft werden, ob im Schlickwatt eine Nährstoff-limitierung vorlag, bzw., ob in unserem Fall durch gezielte Nährstoffgaben eine Steigerung der Lebendkeimzahlen (TCFU) möglich war. Dazu dienten die Versuchsflächen 1.1. - 1.5. (Februar - Juni 1983).

Die ersten Proben zur Lebendkeimzahlbestimmung auf Fläche I (Felder 1.1. - 1.5.) wurden vor einer ersten Bearbeitung gewonnen und zeigten den Zustand des Watts zu Beginn des Versuchslaufs. Der Mittelwert der Keimzahlen betrug für alle 5 Testflächen ca. 6×10^5 N/g Feuchtsediment (5,8 log N/g Feuchtsediment, s. Abb. 10 - Februar bis Juni).

Nach Bearbeitung bzw. Düngung sanken die Lebendkeimzahlen in allen Feldern auf durchschnittlich 2×10^5 N/g Feuchtsediment (5,3 log N/g Feuchtsediment), d.h. auf 33 % des Ausgangswertes. Dies war allerdings auch für das nicht behandelte Feld 1.1. der Fall. Im weiteren Verlauf schwankten die ermittelten Lebendkeimzahlen auf allen Feldern mehr oder weniger stark, wobei bei den Testfeldern 1.2. bis 1.5. die Lebendkeimzahlen Ende April auf durchschnittlich 6×10^4 N/g Feuchtsediment (4,8 log N/g Feuchtsediment) sanken. Zum gleichen Zeitpunkt war die Keimzahl für das unbehandelte Feld 1.1. auf $1,7 \times 10^6$ N/g Feuchtsediment (6,2 log N/g Feuchtsediment) gestiegen. Die Probenahme vom 30.06.1983 ergab für alle Testfelder die

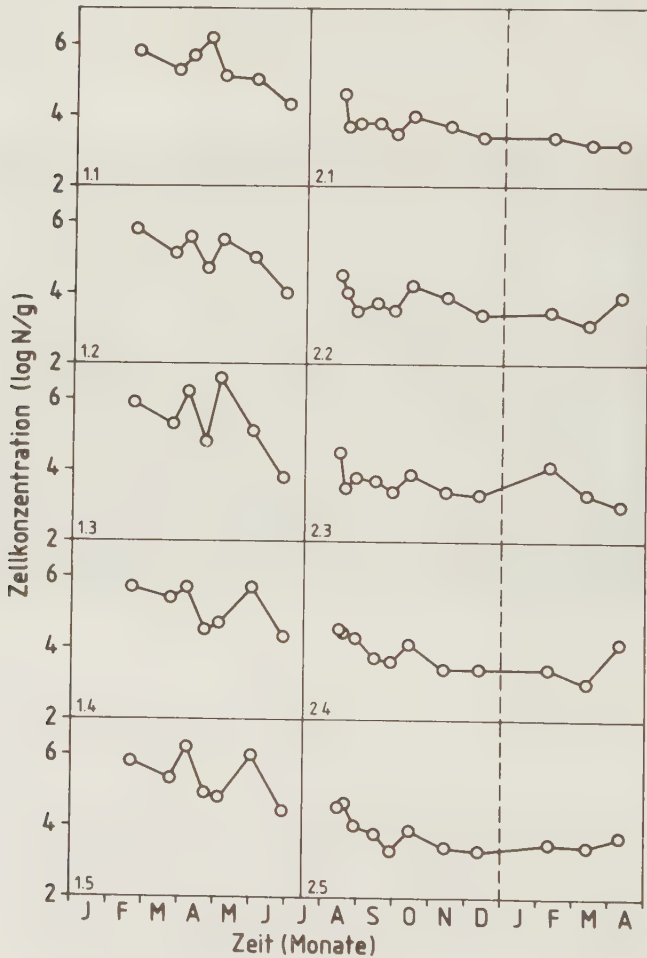


Abb. 10: Zellkonzentration (TCFU) der Schlickwattoberfläche der Testfelder 1.1. - 1.5. (1983) und 2.1. - 2.5. (1983/84), Vareler Watt, im Jahresverlauf.
o = log N/g Feuchtsediment

niedrigsten Keimzahlen, gekoppelt mit einem augenfälligen Anstieg der Diatomeendichte. Bei dieser Probenahme kamen erstmals M₁K-Agarplatten, d.h. mit künstlichem anstatt natürlichem Seewasser, zum Einsatz.

Die Düngung der Testfelder (1.3., 1.4. und 1.5.) hatte vernachlässigbare Einflüsse auf die Lebendkeimzahlen. Lediglich das mit Stickstoff behandelte Testfeld (1.3.) zeigte von März bis Ende Juni durchschnittlich leicht erhöhte Lebenkeimzahlen pro g Feuchtsediment. Die Nährstoffversorgung der Schlickwatt-Oberfläche konnte somit, obwohl es sich um relativ nährstoffarme Flächen handelte (Höpner et al., 1985a) als für Mikroorganismen ausreichend angesehen werden. Dies steht im Gegensatz zur Situation im Meerwasser (Atlas & Bartha, 1972). Die niedrigen Lebendkeimzahlen Ende Juni 1983 hatten vermutlich einen direkten Bezug zum verstärkt vorhandenen Diatomeenrasen. Auf der Wattoberfläche kommen Diatomeen u.a. mit Bakterien vergesellschaftet vor. Diese Vergesellschaftung kann für Bakterien negative Auswirkungen haben, z.B. durch von Diatomeen ausgeschiedene Schleime bzw. interspezifische Konkurrenz hinsichtlich der Nährstoffe auf der Sedimentoberfläche (Kant & Michaelsen, 1985). Von zusätzlichem Einfluß auf die Lebendkeimzahlen könnte die bei der Aufarbeitung dieser Probenahme erstmalige Verwendung künstlichen Seewassers bei der TCFU-Bestimmung sein. Wie die Resultate des Abschnitts 3.4. ergaben, verringerten sich dort bei Ersatz natürlichen durch künstliches Seewasser im Medium die Lebendkeimzahlen um ca. einen Faktor 10 pro g Feuchtgewicht. Die Mikroorganismen nutzten vermutlich Reste organischer Substanzen aus dem natürlichen Seewasser. Mit der Verwendung künstlichen Seewassers wurde eine mögliche zusätzliche C-Quelle außer dem Röhöl eliminiert, was zu der o.g. Keimzahlreduzierung führte (s. Abschnitt 3.4.). In den hier vorliegenden Untersuchungen wurde ein M₁K-Medium verwendet, das den Mikroorganismen Hefeextrakt als leicht metabolisierbare C-Quelle anbot.

Der Einfluß auf die Höhe der Keimzahlen durch den Ersatz natürlichen Seewassers durch künstliches ist bei den in diesem Abschnitt ermittelten Daten somit vernachlässigbar gering.

Obwohl man davon ausgehen kann, daß die Keimzahlen im Schlickwatt wesentlich stabiler sind als die im Sandwatt (Krumbein et al., 1984), zeigte sich, daß die Mikroorganismen in den oberen Schlickwattschichten deutlich auf Störungen reagieren. Sowohl die mechanische bzw. chemische Behandlung des Watts als auch die intensive Begehung (s. Abb. 4 und 5) der Probefelder zu Versuchsbeginn bewirkten einen Abfall der Keimzahlen der Oberflächenproben auf allen Feldern. Diese "Sensitivität" zeigte sich z.B. durch die stärkere Irritation des bearbeiteten, aber ungedüngten Feldes (1.2.) im Vergleich zum unbehandelten Feld (1.1.), das sich relativ schnell erholte (s. Abb. 10). Es zeigten sich während des gesamten Beobachtungszeitraumes witterungs- und begehungsbedingte Lebendkeimzahlsschwankungen. Insgesamt ist zur Jahresmitte hin für alle Felder ein Absinken der Keimzahlen (TCFU) pro g Feuchtsediment erkennbar (Kant & Michaelsen, 1985).

Im nächsten Schritt sollte die Fragestellung geprüft werden, wie sich die Verölung des Probeflächensediments auf die Lebendkeimzahlen (TCFU) der Mikroorganismen auswirkte. Es dienten dazu die Versuchsflächen 2.1. - 2.5. (August 83 - April 84). Dabei wurde die Kombination Verölung mit und ohne Nährstoffzugabe getestet (s. Tab. 5). Die Nährstoffzugabe wurde erneut getestet, obwohl aus den Versuchsflächen 1.1. - 1.5. resultierte, daß in dem betreffenden Gebiet die Nährstoffversorgung der Wattoberfläche als ausreichend anzusehen war. Bei den neuen Versuchsflächen handelte es sich jedoch um ein nährstoffärmeres Areal - als Indikator diente das Diatomeenwachstum (Höpner et al., 1985a) - und unterschied sich dadurch von den vorhergehenden Probeflächen. Auch sollte geprüft werden, ob

durch den Ölabbau ein erhöhter Nährstoffverbrauch zu verzeichnen war. Anhand der zeitlichen Keimzahlentwicklung sollten die Einflüsse dieser Parameter geprüft werden.

Nach der Ruhepause im Juli 1983 wurde eine Probe zur Feststellung der Ausgangssituation bei Abstecken der neuen Testflächen 2.1. - 2.5., also wiederum vor Bearbeitung und Verölung bzw. Düngung der Testflächen am 15.08.1983, durchgeführt. Es zeigte sich, daß die neuen Probeflächen eine akzeptable Ausgangsbasis für die Fortführung der Messungen boten, da die Lebendkeimzahlen pro g Feuchtsediment mit ca. 3×10^4 ($4,5 \log$ N/g Feuchtsediment) mit der Bakterienbesiedlungsdichte der Testfelder 1.1. - 1.5. vom 30.06.1983 vergleichbar waren. Auch dies ist in Abb. 10 erkennbar, in der der Logarithmus der Lebendkeimzahlen pro g Feuchtsediment im Jahresverlauf 1983 sowohl für die Testflächen 1.1. - 1.5. als auch für die Flächen 2.1. - 2.5. dargestellt ist. Diese Darstellung erfolgte, obwohl die Versuchsflächen z.T. unterschiedlich bearbeitet worden waren, in einer gemeinsamen Graphik, da es sich erstens von der Keimzahlausgangsposition um vergleichbare Flächen handelte und zweitens der Einfluß der Bearbeitung im Jahresverlauf so anschaulicher ist. Die Probenahme am 18.08.1983, also die erste Probenahme 3 Tage nach Bearbeitung, Verölung bzw. Düngung der neu angelegten Testflächen, zeigte, daß die Lebendkeimzahlen (TCFU) sowohl des unbearbeiteten Kontrollfeldes (2.1.) als auch des Feldes mit Sandauflage (2.2.) sowie des Feldes mit Sand- und Nährstoffauflage (2.3.) mit einem Durchschnittswert von 6×10^3 N/g Feuchtsediment ($3,8 \log$ N/g Feuchtsediment) um 80 % im Vergleich zur Null-Kontrolle (15.08.1983) abgesunken waren. Auffallend war die mit dem Durchschnittswert von $3,1 \times 10^4$ N/g Feuchtsediment ($4,5 \log$ N/g Feuchtsediment) nahezu konstant gebliebene Besiedlungsdichte der verölten Felder (2.4. und 2.5.). Bei der elf Tage später (29.08.1983) stattgefundenen Probenahme ergab sich für das unbehandelte Kontrollfeld (2.1.), für das

Feld mit Sandauflage (2.2.) sowie für das Feld mit Sand- und Nährstoffauflage (2.3.) wiederum eine durchschnittliche Besiedlungsdichte von 6×10^3 N/g Feuchtsediment ($3,8 \log$ N/g Feuchtsediment). Auch für das mit Sand und Öl behandelte Feld (2.5.) war die Lebendkeimzahl zu diesem Zeitpunkt auf dieses Niveau abgefallen, wogegen für das mit Sand, Nährstoffen und Öl behandelte Feld (2.4.) kein signifikantes Absinken verzeichnet werden konnte. Erst im September fiel auch die Lebendkeimzahl dieses Probefeldes (2.4.) auf das Niveau der anderen Probefelder ab. Für alle Testfelder ließ sich nun eine Lebendkeimzahl von $5,7 \times 10^3$ N/g Feuchtsediment ($3,8 \log$ N/g Feuchtsediment) als Durchschnittswert angeben. Nach einem kurzfristigen Keimzahlanstieg im Oktober auf allen 5 Feldern auf durchschnittlich 1×10^4 N/g Feuchtsediment ($4,0 \log$ N/g Feuchtsediment) fielen die Keimzahlen zum Jahresende hin auf allen Feldern gleichmäßig ab. In der ersten Jahreshälfte 1984, d.h. bis Anfang April, waren vernachlässigbare Änderungen der Lebendkeimzahlen gegenüber der letzten Jahreshälfte 1983 festzustellen. Lediglich die Felder 2.2. (Sandbeimengung) und 2.4. (Sand-Nährstoff-Ölgemisch) zeigten einen Anstieg der Keimzahlen zum Frühjahr. Dagegen fielen die Werte vom Testfeld 2.3. (Sand + Nährstoffe) wieder ab.

Eine Keimzahlsteigerung durch Nährstoffzugabe konnte auf den Testfeldern 2.1. - 2.5. also nicht festgestellt werden. Um die Anzahl der Versuchsparameter in einem versuchstechnisch durchführbaren Rahmen zu halten, kamen hier Stickstoff und Phosphat gemeinsam als $\text{Mg}(\text{NH}_4)\text{PO}_4$ zum Einsatz. Da mit Stickstoff allein also nicht mehr gedüngt wurde, ist ein Vergleich der Auswirkung im Zusammenhang mit Öl auf die Mikroorganismen zur geringfügig keimzahlsteigernden Wirkung von Stickstoff (ohne Öl) auf Testfeld 1.3. nicht möglich.

Die natürliche Nährstoffversorgung der Wattoberfläche konnte also, da keine Lebendkeimzahlsteigerungen durch Düngung festgestellt wurden, als für Mikroorganismen ausreichend angesehen werden (Resultate der Versuchsflächen 1.1. - 1.5. und 2.1. - 2.5.).

Ölzugabe erzeugte weder eine Keimzahlsteigerung noch einen Abfall. Allerdings konnte bei den mit Öl behandelten Feldern 2.4. und 2.5. beobachtet werden, daß der nach der Bearbeitung der Probefelder zu verzeichnende Abfall der Lebendkeimzahl pro g Feuchtsediment wesentlich langsamer verlief als bei den übrigen Feldern. Ein erhöhter Nährstoffbedarf durch den Ölabbau konnte mit Hilfe des Indikators Keimzahlen nicht festgestellt werden. Die Keimzahlen verlaufen bei den verölten Testflächen mit oder ohne Nährstoffzugabe annähernd gleich.

Die zum Jahresbeginn 1984 ermittelten Lebendkeimzahlen lagen durchschnittlich um den Faktor 10^2 niedriger als die Werte der Testfelder 1.1. - 1.5. vom ersten Halbjahr 1983. Wie auch bei Krumbein et al. (1984), stellte sich die Frage, ob es sich hierbei um eine lokal begrenzte Sonder-situation handelte (Kant & Michaelsen, 1985). Sedimentproben ca. 20 m von den Testflächen entfernt entnommen, zeigten aber, daß dies nicht der Fall war, da die Keimzahlen dort genauso niedrig lagen, wie auf den Testflächen. Hinweise auf Gründe für das unterschiedliche Verhalten (Sinken bzw. Steigen) der Keimzahlen der Felder 2.1. - 2.5. im Frühjahr 1984 ergaben sich nicht.

Betrachtet man in Abb. 10 den Verlauf der Lebendkeimzahlen der Felder 1.1. - 1.5. und 2.1. - 2.5. über das Jahr, so sind, wie bereits von Gunkel (1968b) beobachtet, die jahreszeitlich bedingten Keimzahlsteigerungen im Frühjahr, im Herbst hier allerdings weniger deutlich, erkennbar.

In einem weiteren experimentellen Schritt sollte die Wirkung einer Ölkontamination im Vergleich zu einer Ölkontamination mit Dispergatoreinsatz auf die Lebendkeimzahlen untersucht werden. Dazu dienten die Testflächen 3.1. - 3.5. (Mai - Dezember 84). Es wurden folgende Dispergatoren eingesetzt: Corexit 9527, Metryl OD und THL (s. Tab. 5).

Für die am 23.05.1984 neu angelegten Testfelder (3.1. - 3.4., s. Tab. 5) wurde die erste Probenahme wieder vor Bearbeitung der Felder durchgeführt. Für alle Felder ergab sich eine durchschnittliche Lebendkeimzahl von 10^3 N/g Feuchtsediment bzw. $1,9 \times 10^3$ N/g Trockensediment (entspricht $3,3 \log$ N/g Trockensediment). Die Keimzahlen sind in Abb. 11a und 11b sowohl für 1 g Trockensediment als auch für 1 g Feuchtsediment eingetragen.

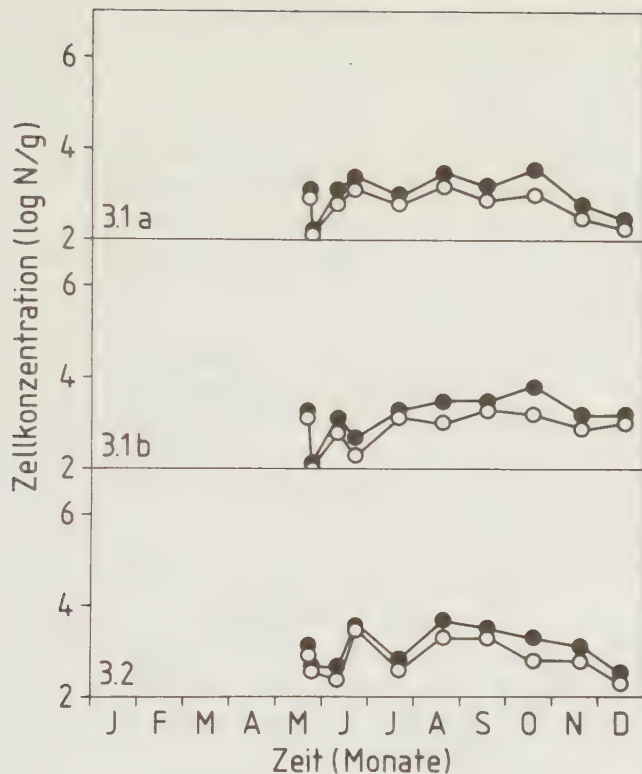


Abb. 11a: Zellkonzentration (TCFU) der Schlickwattoberfläche der Testfelder 3.1. - 3.2. (1984), Vareler Watt, im Jahresverlauf.

● = log N/g Trockensediment

○ = log N/g Feuchtsediment

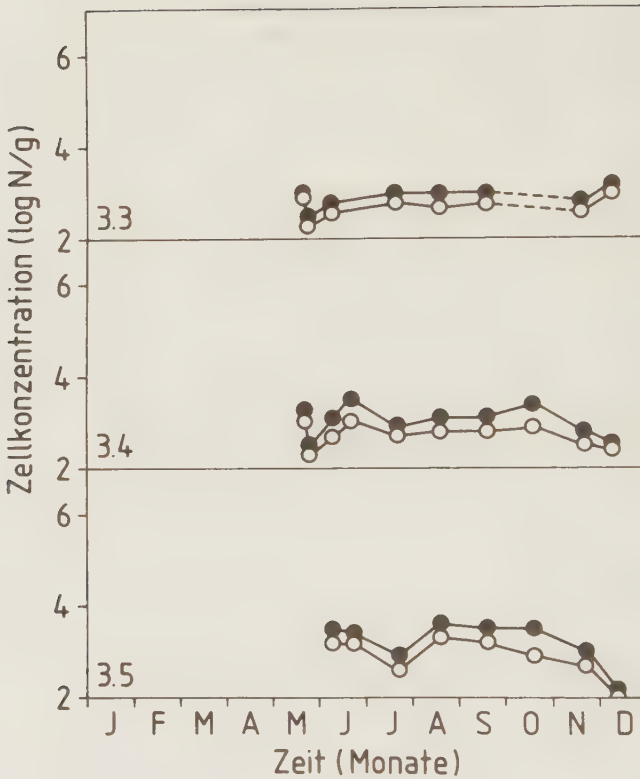


Abb. 11b: Zellkonzentration (TCFU) der Schlickwattoberfläche der Testfelder 3.3. - 3.5. (1984), Vareler Watt, im Jahresverlauf.

- = log N/g Trockensediment
- = log N/g Feuchtsediment

Die Probenahme am folgenden Tag nach der Kontamination ergab einen Abfall der Lebendkeimzahlen/g Sediment (s. Abb. 11a und 11b). 14 Tage später (07.06.84) wurde das Testfeld 3.5. angelegt und mit einem Sand-Öl-Metryl OD-Gemisch überschichtet. Die vor der Bearbeitung entnommene Oberflächensedimentprobe ergab eine Lebendkeimzahl von $2,9 \times 10^3$ N/g Trockensediment ($3,5 \log$ N/g Trockensediment) und war damit vergleichbar mit den anderen Keimzahlwerten vor der Feldbearbeitung ($1,9 \times 10^3$ N/g Trockensediment). Ob direkt nach der Kontamination ein Abfall der Lebendkeimzahlen des Feldes (3.5.) stattfand, konnte nicht festgestellt werden, weil die nächste Probenahme nicht, wie bei den anderen Testfeldern (3.1. - 3.4.) am darauffolgenden Tag, sondern erst 14 Tage später (21.06.84), zusammen mit den Probenahmen der Testfelder (3.1. - 3.4.) stattfand. Diese ergab für das mit Sand, Öl und Metryl OD behandelte Feld (3.5.) nahezu gleich hohe Keimzahlwerte wie vor der Bearbeitung (s. Abb. 11b). Die Lebendkeimzahlen von Feld 3.1.a (unbehandelt) lagen bis einschließlich Oktober um 2×10^3 N/g Trockensediment ($3,3 \log$ N/g Trockensediment, s. Abb. 11a). Feld 3.1.b (mit Sandauflage) wies bis einschließlich Oktober steigende Keimzahlen bis auf $5,8 \times 10^3$ N/g Trockensediment ($3,8 \log$ N/g Trockensediment, s. Abb. 11a) auf. Feld 3.2. (Sandauflage + Öl) hatte mit $5,4 \times 10^3$ N/g Trockensediment ($3,7 \log$ N/g Trockensediment) den höchsten Wert im August (s. Abb. 11a). Die Testfelder 3.3. (Sand, Öl, Corexit 9527) und 3.4. (Sand, Öl, THL) blieben im Durchschnitt geringfügig unterhalb des Ausgangswertes (s. Abb. 11b). Die Lebendkeimzahlen von Feld 3.5. (Sand, Öl, Metryl OD) sanken im Juli auf $0,8 \times 10^3$ N/g Trockensediment ($2,9 \log$ N/g Trockensediment) ab und erzielten den höchsten Wert mit $4,1 \times 10^3$ N/g Trockensediment ($3,6 \log$ N/g Trockensediment) im August (s. Abb. 11b). Die Keimzahlen der Testfelder 3.1.a, 3.1.b, 3.3. und 3.4. fielen ab Oktober zum Jahresende hin ab. Für die Felder 3.2. und 3.5. war dieser Abfall bereits ab September zu verzeichnen (Kant & Michaelsen, 1985).

Die Keimzahlen der Testfelder 3.1. bis 3.5. lagen insgesamt etwas niedriger als die der Felder 2.1. bis 2.5.. Das mit Corexit 9527 behandelte Feld 3.3. brachte die geringsten Keimzahlen pro g Trockensediment der Versuchsfelder 3.1. - 3.5.. Ein Keimzahlanstieg zum Herbst, wie z.B. bei den Feldern 3.1.a und 3.1.b beobachtet, blieb aus. Die Lebendkeimzahlen erreichten erst im Dezember 1984 wieder den Ausgangswert. Für das mit THL behandelte Feld 3.4. zeigte sich ein langsamer Keimzahlanstieg, gefolgt von durchschnittlich niedrigeren Keimzahlen verglichen mit den Testfeldern ohne Detergenzienzusatz. Das mit Metryl OD behandelte Testfeld (3.5.) wies eine längere Keimzahl-Absinkphase (ca. 2 Monate) im Vergleich zu den anderen Feldern auf. Ein Anstieg war erst im August wieder zu beobachten. Man kann allgemein davon ausgehen, daß dispergiertes Öl mikrobiologisch besser abgebaut wird. Es wirken aber viele Detergenzien auf vielfältige Art hemmend auf Mikroorganismen (ZoBell, 1969). Dies traf auch für die Testflächen im Vareler Schlickwatt zu, wobei besonders die oben erwähnte negative Wirkung des Rohöl-Corexit 9527-Gemisches auf die Mikroorganismen auffiel. So wurde die höchste Keimzahlsteigerung (bezogen auf die Ausgangswerte) im Öl-Testfeld 3.2. (ohne Detergenzien) erzielt. Obwohl die Sand-Öl-Detergenzien-Gemische indessen unter einer Schlickschicht lagen, waren die negativen Auswirkungen auf die Oberflächenmikroorganismen deutlich. Zwar ergab sich für das Testfeld 3.2. (Öl) eine verlängerte Phase (ca. 15 Tage) mit niedrigen Keimzahlen nach der Behandlung, die Mikroorganismenpopulation erholte sich aber, wie auch von Krumbein et al. (1984) beobachtet, rasch, so daß eine maximale Keimzahlsteigerung (bezogen auf den Ausgangswert) von 315 % erreicht wurde, die somit höher lag als die Maximalsteigerung des Feldes 3.1.b (Sand) mit 190 %. Nach den Ergebnissen der Felder 3.1. - 3.5. kann man davon ausgehen, daß die Auswirkungen von Öl allein auf das Wachstum der Keimzahlen gering waren im Vergleich zu den Öl-Detergenz-Gemischen.

Bei allen bisherigen Probenahmen war die Keimzahl auf der Oberfläche des Sediments bestimmt worden. Da die aufgebrauchten Sand-öl-Schichten auf den Versuchsfeldern im Laufe der Zeit durch Überschlückungen immer tiefer im Sediment lagen und also besonders kurz vor Beendigung der jeweiligen Versuchsläufe die Keimzahlen an der Sedimentoberfläche eventuell nicht mehr repräsentativ für die Feldbehandlung waren, stellte sich die Frage, wie die Keimzahlverteilung im Tiefenprofil aussähe. Es wurden exemplarisch für die Testflächen Tiefenprofile erstellt (Testflächen 2.1. - 2.5.: Tiefenprofil aus Feld 2.5.; Testflächen 3.1. - 3.5.: Tiefenprofile aus Feldern 3.2. und 3.3.). Zusätzlich wurde bei ausgewählten Proben des Tiefenprofils der Versuchsflächen 2.1. - 2.5. eine Flüssiginkubation angeschlossen, die zeigen sollte, ob Mikroorganismen, die mit dem Öl in tiefere, z.T. anaerobe Sedimentschichten abgesunken waren, unter aeroben Bedingungen mit und ohne Ölzusatz vermehrungsfähig, d.h. mobilisierbar waren.

Anhand des Tiefenprofils der Testfläche 2.5. (Sand-öl-Gemisch) vom 13.3.84 wurden die Lebendkeimzahlen pro g Trockensediment bis 5,0 cm Sedimenttiefe (s. Abschnitt 2.5.5.) ermittelt. Beim Zerschneiden der Kerne konnte die Ölschicht sowohl visuell als auch olfaktorisch in 2,0 cm Tiefe lokalisiert werden. Mit 1×10^3 ($3,0 \log N$) wurde die maximale Lebendkeimzahl pro g Trockensediment in 1,5 cm Schichttiefe gemessen (s. Abb. 12a) und lag nur geringfügig höher als die Keimzahlen auf der Sedimentoberfläche mit $6,3 \times 10^2$ N/g ($2,8 \log N/g$) Trockensediment. Die Lebendkeimzahlwerte pro g Trockensediment betrugen in 0,5 cm Tiefe 5×10^2 ($\log 2,7$) und in 1,0 cm Tiefe $6,3 \times 10^2$ ($\log 2,8$, s. Abb. 12a). Die Werte über der Ölschicht zeigten, daß auch nach Absinken der Öl-Sand-Schicht ins Sediment die Oberflächenkeimzahlen noch in vergleichbarer Höhe liegen, womit sie hier als repräsentativ angesehen werden können (s.a. Diskussion).

Im Anschluß an die Erstellung der Lebendkeimzahlprofile wurde die Flüssiginkubation (s. Abschnitt 2.5.5.) durchgeführt. Definierte Mengen Sediment ausgewählter Schichten wurden dazu in Flüssigmedium nachinkubiert. Die Lebendkeimzahl nach der ersten Inkubationsphase (ohne Zusatz von Öl) ergab eine durchschnittliche Steigerung von ca. 10^3 auf ca. 10^5 N/g Trockensediment. Höhere Verdünnungen, eingesetzt bei der Weiterinkubation unter Zusatz von Öl, ergaben noch bessere Ergebnisse, nämlich auf 10^7 N/g Trockensediment, wobei es vernachlässigbare Unterschiede zwischen den einzelnen Sedimentschichten gab. Die Flüssiginkubationen zeigten also, daß das Vermehrungspotential der Mikroorganismen erhalten geblieben war. Beim Zusatz von Öl steigerte sich die Lebendkeimzahl erneut im Vergleich zur Inkubation ohne Öl. Dies ist zurückzuführen auf die Anreicherung potentiell ölabbauender Mikroorganismen sowie auf die Vermehrung der heterotrophen Mikroorganismen, denen durch Öl-Abbauprodukte erneute C-Quellen zur Verfügung standen.

Für die Testflächen 3.1. - 3.5. wurden anhand exemplarischer Tiefenprofile der Testfelder 3.2. und 3.3. die Lebendkeimzahlen pro g Trockensediment bis 5,0 cm Tiefe ermittelt (s. Abb. 12b+c). Beim Zerschneiden (s. Abschnitt 2.5.5.) war die Ölschicht nicht erkennbar. Die Ölschicht war in keinem Feld tiefer als 6 cm, meist nur bis 4,5 cm tief ins Sediment eingedrungen (s. Abb. 13).

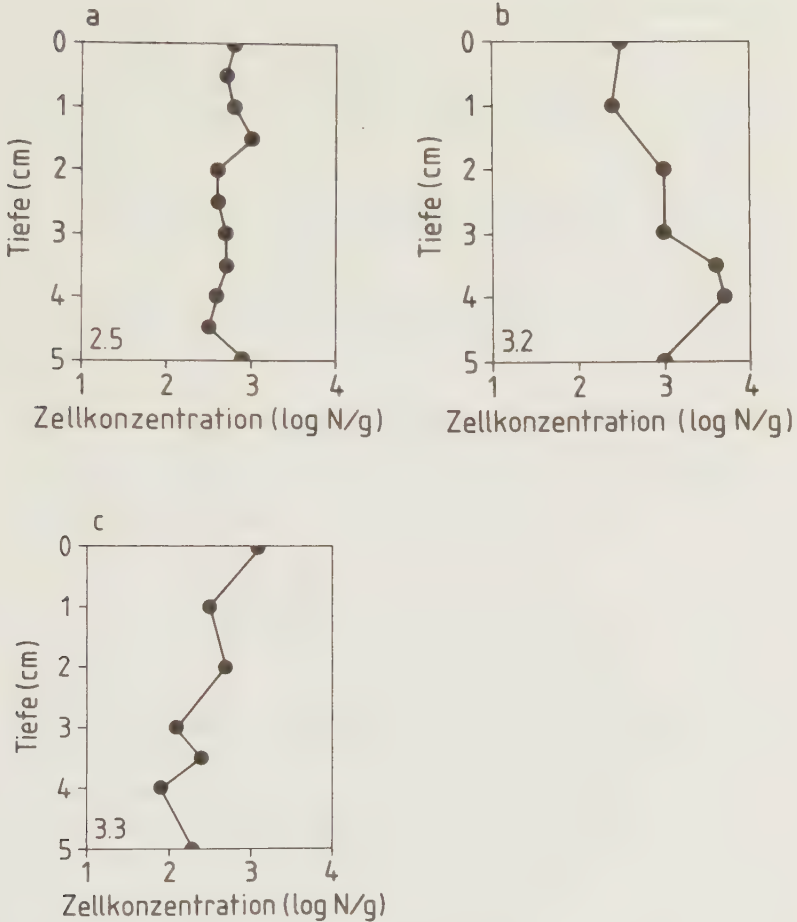


Abb. 12: Zellkonzentration (TCFU) im Tiefenprofil der Schlickwatt-Testflächen 2.5. (13.3.84) sowie 3.2. und 3.3. (17.12.84), Vareler Watt.

- a) 2.5. Öl/Sandgemisch (10 kg Sand + 300 g Öl/m²),
b) 3.2. Öl/Sandgemisch (10 kg Sand + 360 g Öl/m²),
c) 3.3. Öl/Sand/Corexitgemisch (10 kg Sand + 360 g Öl + 10 % (w/w) Corexit 9527).

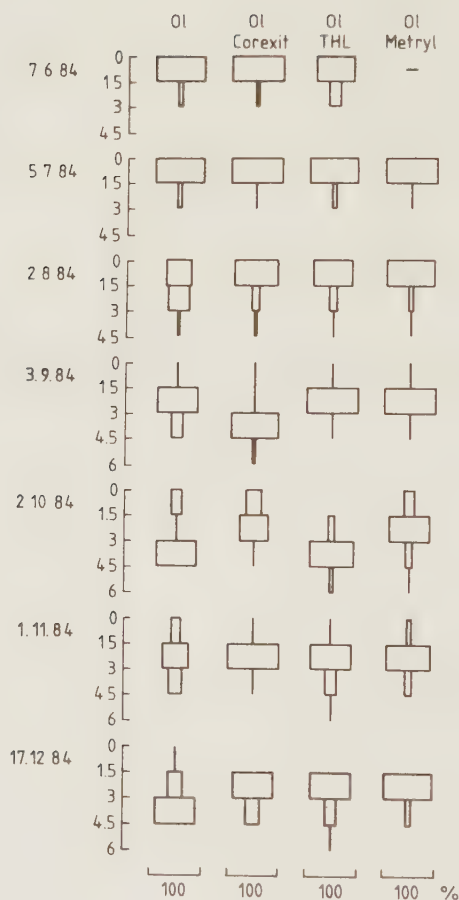


Abb. 13: Verteilung des Öls zu den angegebenen Zeitpunkten auf die Sedimentschichten 0 bis 1,5; 1,5 bis 3; 3 bis 4,5 und 4,5 bis 6 cm in % der in dem jeweiligen Kern vorhandenen Gesamtmenge (siehe Angabe 100 % unterer Bildrand). Strich "ohne Breite": Öl nachgewiesen, aber unter ca. 1 % der Gesamtmenge (aus Höpner et al., 1985a).

Für das mit Sand und Öl kontaminierte Testfeld 3.2. lagen die Oberflächenkeimzahlen bei 3×10^2 N/g ($\log 2,5$ N/g) Trockensediment. Die maximal ermittelte Lebendkeimzahl wurde hier in 4 cm Tiefe mit 5×10^3 N/g ($\log 3,7$ N/g) Trockensediment gefunden. Vergleicht man Feld 3.2. mit Feld 2.5., das ebenfalls mit einer Sand/Öl-Mischung kontaminiert worden war (jedoch mit einer um 60 g Öl/m^2 geringeren Flächenbelastung als Feld 3.2., s. Tab. 5), läßt sich feststellen, daß bei beiden Testflächen die maximalen Keimzahlen des Tiefenprofils direkt über der Ölschicht gemessen wurden. Außer der differierenden Ölmenge unterscheidet sich Feld 3.2. von Feld 2.5. dadurch, daß der Ölhorizont durch Sedimentauflagerungen tiefer abgesunken war und die Differenz der maximal gemessenen Keimzahl zur Oberflächenkeimzahl hier höher ist (ca. eine 10er-Potenz, 5×10^3 N/g zu 3×10^2 N/g Trockensediment; s. Abb. 12a+b).

Bei dem für den Dispergatoreneinsatz exemplarisch geprüften Testfeld 3.3. (Öl/Corexit 9527-Behandlung, s. Tab. 5) wurden die höchsten Lebendkeimzahlen auf der Sedimentoberfläche gemessen (1×10^3 N/g oder $3,1 \log$ N/g Trockensediment). Mit zunehmender Tiefe sanken sie ab (s. Abb. 12c). Wie bereits bei den Oberflächenkeimzahlen (s. Abb. 11b) zeigten sich auch im Tiefenprofil die negativen Auswirkungen des Rohöl-Corexit-Gemisches auf die Keimzahlen. Ein Anstieg der Keimzahlen über der Ölschicht, wie bei den Feldern 2.5. und 3.2., blieb vermutlich aufgrund der toxischen oder hemmenden Wirkung des Corexit aus. Die Oberflächenkeimzahlen sind die höchsten des Tiefenprofils, vermutlich da sie am wenigsten mit dem Corexit in Berührung kommen. Ausgehend von den höheren Lebendkeimzahlen beim Feld 3.2. (Öl) im Vergleich zu dem zusätzlich mit Dispergator behandelten Testfeld 3.3. kann angenommen werden, daß der Ölabbau im Schlickwatt ohne Detergentienzusatz - hier nachgewiesen für Corexit 9527 - besser, d.h. schneller stattfindet.

3.2. Laboruntersuchungen zum mikrobiellen Kohlenwasserstoffabbau in Wattsedimenten

Es wurde zunächst die Fragestellung geprüft, wie sich die Zugabe von Nährstoffen, wie Stickstoff und Phosphat, auf die Lebendkeimzahlkonzentration (TCFU) der Mikroorganismen im Schlick- bzw. Sandwatt auswirkte.

Im Schlickwatt wurde, wie Abb. 14a zeigt, die maximal erreichten Lebendkeimzahlen durch die Nährstoffzugaben (N,P) nicht beeinflußt. Die Nährstoffversorgung des aeroben Schlickwatts konnte also hinsichtlich der Mikroorganismen als ausreichend angesehen werden, obwohl es sich um Sedimentproben aus nährstoffarmen Arealen (s. Abschnitt 2.5.2.) handelte. Dieses Resultat deckte sich mit den bereits durchgeführten Felduntersuchungen (s. Kap. 3.1.), wo die gleichen Sedimente wie bei den Standard-Ansätzen (s. Abschnitt 2.5.2.), allerdings mit der im Freiland vorliegenden Sauerstofflimitierung, untersucht worden waren.

Anders verhielten sich die Lebendkeimzahlwerte (TCFU) im Sandwatt. Sie ließen sich, wie Abb. 14b zeigt, durch Nährstoffzugaben deutlich steigern. Der Zusatz von 12 mg N und 1,2 mg P rief eine Keimzahlsteigerung von 77 % im Vergleich zum ungedüngten Sandwatt hervor. Zugaben von 60 mg N und 6,0 mg P bewirkten eine Lebendkeimzahlsteigerung von 101 %. Beim untersuchten Sandwatt läßt sich aus den Resultaten ableiten, daß dort, im Gegensatz zum untersuchten Schlickwatt, offensichtlich endogenes organisches Material vorhanden war, das bei dem zuvor vorliegenden Nährstoffmangel nicht abgebaut werden konnte.

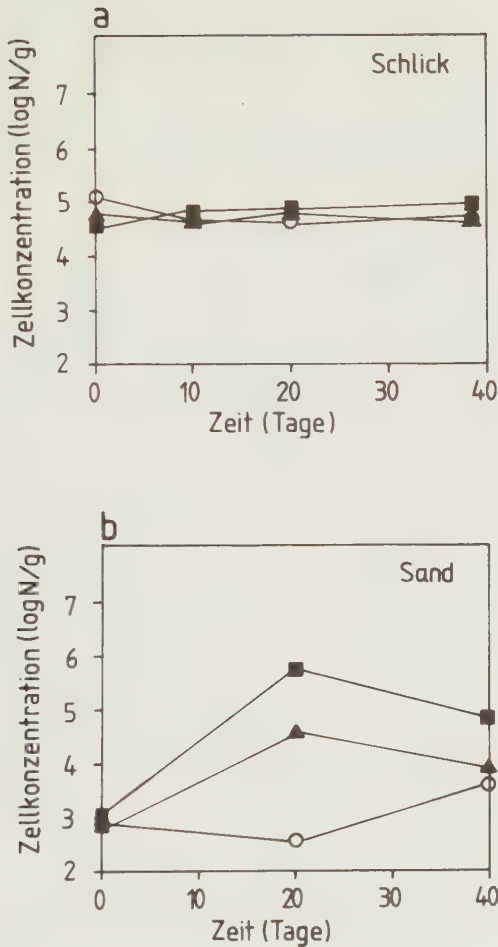


Abb. 14: Einflüsse von Nährstoffen auf die Entwicklung der Zellkonzentration (TCFU) im Standardansatz (s. 2.5.2.). (-o-o-) ohne Nährstoffe, (-▲-▲-) mit 12 mg N (als NaNO_3) und 1,2 mg P (als NaH_2PO_4), (-■-■-) mit 60 mg N und 6 mg P pro Standardansatz. a) Schlickwatt, b) Sandwatt.

Aufgrund der im Freiland vorliegenden Sauerstoff-limitierung im Sediment war die Nährstoffversorgung des Schlickwatts bei Kohlenwasserstoffabbau ausreichend gewesen (s. Abschnitt 4.1.). Die Frage war nun, ob die Nährstoffversorgung für den mikrobiologischen Abbau zugesetzter Kohlenwasserstoffe noch ausreichend war, wenn man das Sediment aerob hält. Dies sollten die Versuche des folgenden Abschnitts beantworten.

Für diese Untersuchungen wurde mit zwei verschiedenen Schlickwatt-Sedimenttypen gearbeitet, mit denen unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden. Die eine Wattsedimentprobe stammte aus einem aperiodisch überfluteten, in Landnähe gelegenen Wattareal (s. Abschnitt 2.6.1.). Die Sedimentprobennahme (s. Abschnitt 2.5.2.) erfolgte im Sommer. Die zweite Wattsedimentprobe stammte aus einem periodisch überfluteten Gebiet (s. Abschnitt 2.6.1.) und die Sedimententnahme (s. Abschnitt 2.5.2.) wurde hier - nach Vereisung im Winter - Anfang März durchgeführt. Bei der aperiodisch überfluteten Wattsedimentprobe blieb - bei Anwesenheit von Nährstoffen - die Zugabe von 500 µl Hexadecan oder Rohöl ohne Einfluß auf die Lebendkeimzahlen (s. Abb. 15a und 15b). Ebensowenig ergab sich bei dieser Wattsedimentprobe bei Zusatz von Kohlenwasserstoffen eine Reaktion der Lebendkeimzahlen auf Nährstoffzugaben (s. Abb. 16a und 16b).

Völlig anders verhielt sich die Wattsedimentprobe aus dem periodisch überfluteten Gebiet. In Anwesenheit von Nährstoffen (N,P) wurde sowohl bei der Zugabe von 500 µl Hexadecan als auch bei 500 µl Rohöl ein Anstieg der Lebendkeimzahlen festgestellt (s. Abb. 17a und 17b). Darüber hinaus konnte in Anwesenheit von Kohlenwasserstoffen durch die Zugabe von Nährstoffen eine Keimzahlsteigerung bewirkt werden (s. Abb. 18a und 18b, untere Kurven).

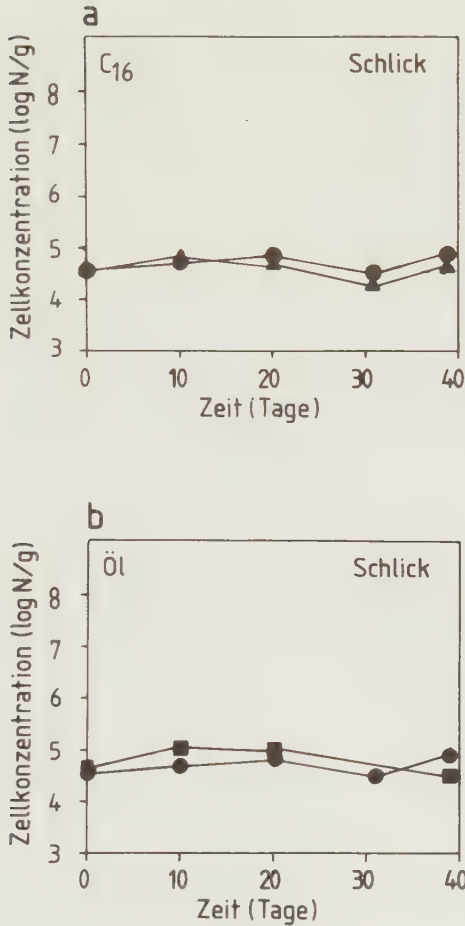


Abb. 15: Einflüsse von Kohlenwasserstoffen auf die Entwicklung der Zellkonzentration (TCFU) im Standardansatz im Schlickwatt (aperiodisch überflutetes Gebiet) unter Zusatz von Nährstoffen (N,P). (-●-●-) ohne Kohlenwasserstoffe. a) (-▲-▲-) mit 500 μ l Hexadecan, b) (-■-■-) mit 500 μ l Rohöl.

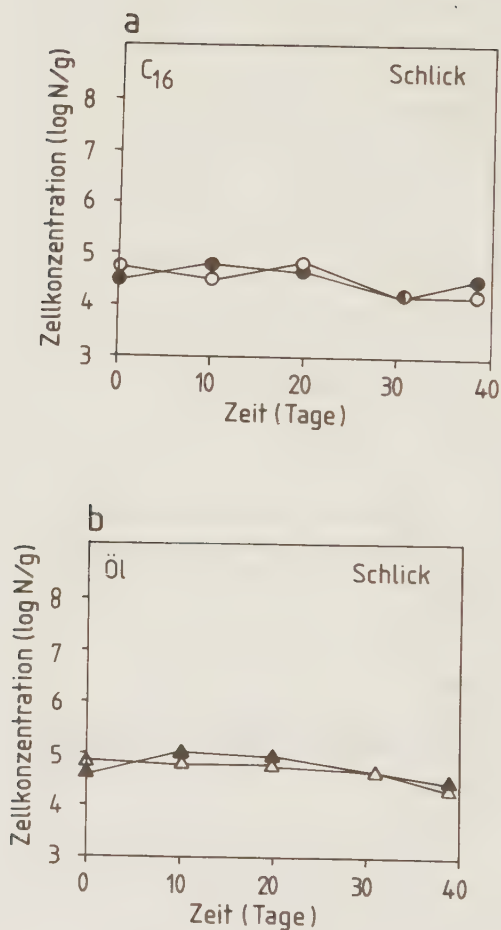


Abb. 16: Einflüsse von Nährstoffen (N,P) auf die Entwicklung der Zellkonzentration (TCFU) im Standardansatz im Schlickwatt (aperiodisch überflutetes Gebiet) unter Zusatz von Kohlenwasserstoffen. Offene Symbole: ohne Nährstoffe, geschlossene Symbole: mit Nährstoffen. a) Hexadecan, b) Rohöl.

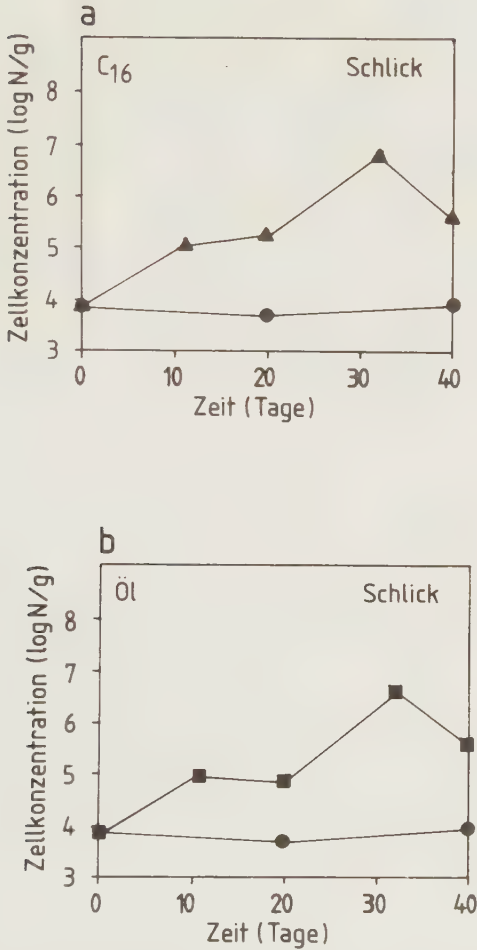


Abb. 17: Einflüsse von Kohlenwasserstoffen auf die Entwicklung der Zellkonzentration (TCFU) im Standardansatz im Schlickwatt (periodisch überflutetes Gebiet) unter Zusatz von Nährstoffen (N,P). (-●-●-) ohne Kohlenwasserstoffe. a) (-▲-▲-) mit Hexadecan, b) (-■-■-) mit Rohöl.

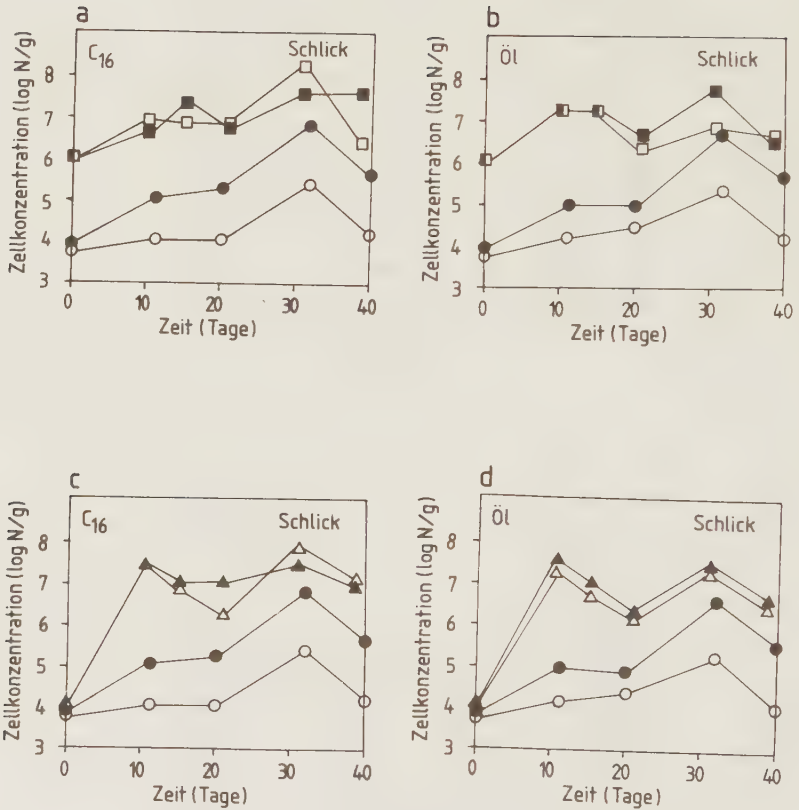


Abb. 18: Entwicklung der Zellkonzentration (TCFU) im Standardansatz im unbehandelten, frischen Schlickwatt (jeweils untere Kurvenpaare) und sterilisiertem Schlickwatt, das mit 10^6 (s. Abb. 18a und b) bzw. 10^4 (s. Abb. 18c und d) N/g Trockensediment angeimpft wurde. Offene Symbole: ohne Nährstoffe, geschlossene Symbole: mit Nährstoffen (N,P). a und c: Hexadecan, b und d: Rohöl.

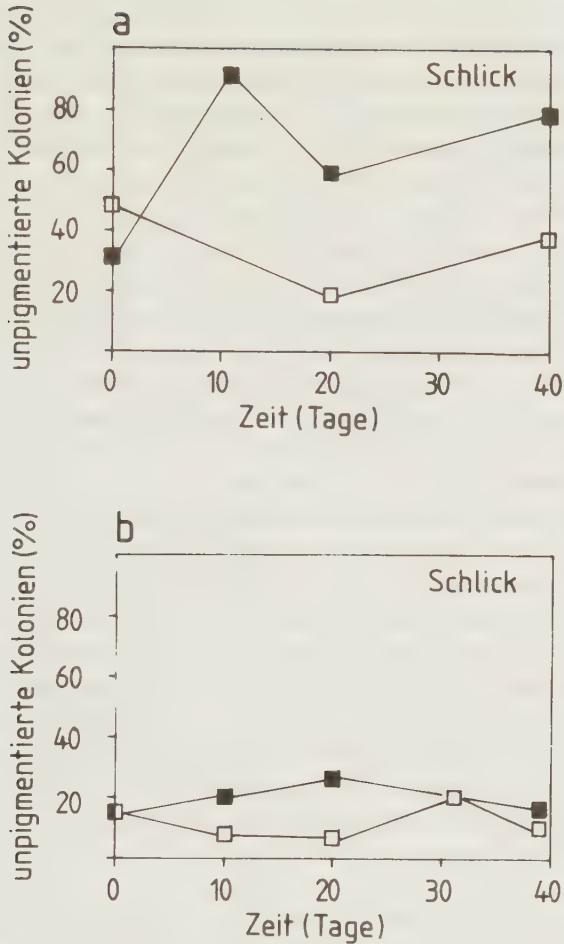


Abb. 19: Prozentualer Anteil ungefärbter Kolonien bei der Lebendkeimzahlbestimmung (TCFU) im Standardansatz. Offene Symbole: ohne Rohöl, geschlossene Symbole: mit Rohöl, in beiden Fällen unter Zusatz von Nährstoffen (N,P).

a) Schlickwatt aus einem periodisch überfluteten Gebiet,

b) Schlickwatt aus einem aperiodisch überfluteten Gebiet.

Diese Resultate lassen sich, wie bereits bei der Untersuchung der Nährstoffversorgung beschrieben, nur durch allgemeine Ausgangsunterschiede der Sedimente erklären. Diese Vermutung wird durch zwei Fakten bestätigt. Erstens ist die Ausgangsposition der Lebendkeimzahlhöhen bei den beiden Wattsedimentproben unterschiedlich. Die Startkeimzahlen unterscheiden sich, wie Abb. 15, 16, 17 und 18a,b (hier untere Kurven) zeigen, um ca. 6×10^4 N/g Trockensediment, die niedrigeren Startkeimzahlen sind dabei bei der periodisch überfluteten Wattsedimentprobe zu finden. Zweitens zeigte sich im Verhältnis gefärbter zu ungefärbten Kolonien auf den Agarplatten ein Unterschied. Bei der aperiodisch überfluteten Sedimentprobe, wo bei Öl- und Nährstoffzugabe kein Keimzahlenanstieg zu verzeichnen war (s. Abb. 15b), stieg der Anteil der ungefärbten Kolonien an der gesamten Lebendkeimzahlhöhe nur von ca. 20 % auf 25 % (Abb. 19b). Ohne Nährstoffzugaben blieb der Anteil der ungefärbten Kolonien unter 20 %. Hingegen stieg bei der periodisch überfluteten Wattsedimentprobe, wo bei Öl- und Nährstoffzugaben ein starker Lebendkeimzahlenanstieg erfolgte (s. Abb. 17a und 17b), der Anteil ungefärbter Kolonien von ca. 40 % auf 70-90 %. In Abwesenheit von Rohöl blieb der Anteil ungefärbter Kolonien bei ungefähr 30 % (s. Abb. 19a). Bei beiden Watt-Sedimentproben differiert der Ausgangsanteil ungefärbter Kolonien an der Gesamt-Lebendkeimzahl um ca. 20 %.

Die Reaktion der Lebendkeimzahlen auf Zugaben von Stickstoff und Phosphat oder Kohlenstoffsubstraten (Hexadecan oder Rohöl) stand also in Abhängigkeit vom "Grundzustand" des untersuchten Sediments. Dieses Resultat konnte durch weitere Untersuchungen bestätigt werden. Das dafür verwendete Sediment stammte erneut aus dem bereits durch die Probenahme Anfang März bekannten, periodisch überfluteten Schlickwattbereich. Für diese Versuche erfolgte die Sedimentprobenahme jedoch im Sommer. Die Experimente wurden mit sterilisiertem Watt, das mit definierten Titern einer

Wattmischpopulation angeimpft wurde, durchgeführt (s. Abschnitt 2.4.2). Wie die Abbildungen 18a,b,c,d (obere Kurven) zeigen, war die Stickstoff- und Phosphatabhängigkeit bei Zusatz von Kohlenwasserstoffen bei diesem Sediment geringer als bei der Probenahme derselben Wattsedimentprobe im Frühjahr (s. Abb. 18a-d, jeweils untere Kurven).

Generell können für das aerobe Schlickwatt bezüglich der Lebendkeimzahldichte bislang folgende Aussagen getroffen werden.

1. Eine Nährstoffabhängigkeit (Stickstoff und Phosphat) der Keimzahlkonzentration in Abwesenheit von Kohlenwasserstoffen besteht nicht.
2. Unter Zusatz von Kohlenwasserstoffen besteht bei der aperiodisch überfluteten Wattsedimentprobe keine Nährstoffabhängigkeit (N,P) der Keimzahlkonzentration; bei der periodisch überfluteten Wattsedimentprobe ist sie vorhanden.
3. In Anwesenheit von Nährstoffen (N,P) läßt sich das Wachstum der Lebendkeimzahlen durch Zusatz von Kohlenwasserstoffen bei der aperiodisch überfluteten Wattsedimentprobe nicht stimulieren. Es läßt sich jedoch bei der periodisch überfluteten Wattsedimentprobe steigern.

Betrachtet man die Kohlenwasserstoffabbaugeschwindigkeiten, die parallel zu Lebendkeimzahlen gemessen wurden, zeigte sich bei den untersuchten Schlickwattproben eine klare Nährstoffabhängigkeit (Kant et al., 1985). Wie in Abb. 20a-20d gezeigt, konnte die Kohlenwasserstoffabbau-geschwindigkeit durch Zugabe von Nährstoffen gesteigert werden. Die untersuchten Proben stammten vom periodisch überfluteten Wattsediment; hier war auch bei der Lebendkeimzahlbestimmung eine Nährstoffabhängigkeit festgestellt worden.

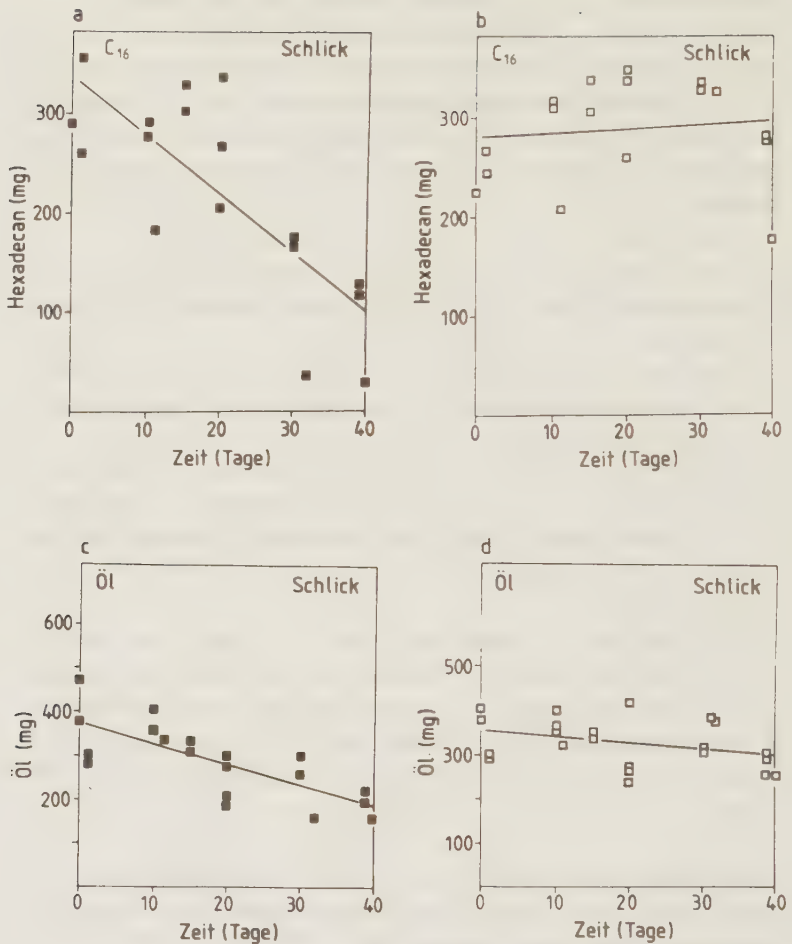


Abb. 20: Zusammenfassung mikrobiologischen Kohlenwasserstoffabbaus, dargestellt als Verlauf der Konzentration (mg/Standardansatz) über der Zeit, ermittelt in Experimenten mit Schlickwatt. a) Hexadecan mit Nährstoffen (N,P), b) dasselbe ohne Nährstoffe, c) Rohöl mit Nährstoffen, d) dasselbe ohne Nährstoffe. Unter der Annahme eines linearen Verlaufs der Konzentrationsabnahme wurden die Regressionsgeraden berechnet (Kant et al., 1985).

Durch Untersuchungen des aeroben Sandwatts konnte bereits eine deutliche Abhängigkeit der Lebendkeimzahlhöhen von den zugefügten Nährstoffen (N,P) demonstriert werden. Weitere Experimente ergaben, daß alleinige Kohlenwasserstoffzugaben nur eine minimale Lebendkeimzahlsteigerung bewirkten. Nur unter Anwesenheit von Nährstoffen (N,P) konnte mit der Kohlenwasserstoffzugabe eine Lebendkeimzahlsteigerung festgestellt werden.

Für das aerobe Sandwatt lassen sich bezüglich der Mikroorganismenkonzentration folgende Aussagen treffen:

1. Die Lebendkeimzahlen werden hauptsächlich durch die Nährstoffe bestimmt.
2. Kohlenwasserstoffzugaben bewirken nur in Kombination mit Nährstoffzugaben (N,P) eine Lebendkeimzahlerhöhung.

Die im Sandwatt ermittelten Abbauraten ergaben, daß ein Abbau von Kohlenwasserstoffen weder mit noch ohne Nährstoffzusatz (N,P) erfolgte (s. Abb. 21).

Die gemessenen Öl- bzw. Hexadecanabbauraten im Schlickwatt waren abhängig von der eingesetzten Kohlenwasserstoffmenge. Die Abbauraten stiegen, wenn die Kohlenwasserstoffzugabe von 100 µl auf 500 µl pro Standardansatz (s. Abschnitt 2.5.2.) erhöht wurde. Bei Hexadecan betrugen sie für 100 µl ca. 1 mg/Tag, für 500 µl 6 mg/Tag. Beim Rohöl waren die Abbauraten für 100 µl ca. 1 mg/Tag, für 500 µl 5 mg/Tag. Interessanterweise wurden die Lebendkeimzahlen bei der Zugabe von 100 µl Kohlenwasserstoff pro Standardansatz weder mit noch ohne Nährstoffzusatz beeinflusst. Diese Konzentration konnte offensichtlich durch die im Sediment vorhandene Population, ohne daß eine Keimzahlvermehrung durch das Kohlenwasserstoff-Substrat hervorgerufen wurde, abgebaut werden. Erst bei der Zugabe von 500 µl Kohlenwasserstoff pro Standardansatz konnte in Abhängigkeit vom Sediment eine Keimzahlsteigerung bewirkt werden.

Es gibt in der Ölbekämpfung trotz wissenschaftlicher Gegenargumente (Tagger et al., 1983, Gunkel, 1984) immer wieder Vorschläge, den Ölabbau durch Einsatz von kohlenwasserstoffoxidierenden Mikroorganismen zu fördern. So wurde die Fragestellung geprüft, ob Statfjordöl-adaptierte Mikroorganismen (s. Abschnitt 2.4.8.), die in definierten Titern sterilisiertem Watt zugefügt wurden, das Lebendkeimzahlverhalten (TCFU) bzw. die Kohlenwasserstoffabbau-geschwindigkeit beeinflussen. Erstmals sollte in dieser Konstellation die Abbaugeschwindigkeit öladaptierter Mikroorganismen im geschlossenen System überprüft werden und zusätzlich, ob die zum Versuchsstart vorliegende Mikroorganismenkonzentration (TCFU) die Ölabbau-geschwindigkeiten beeinflussen.

Wie Abb. 22a und 22b zeigen, erreichen die Versuchsansätze mit dem Starttiter 10^4 N/g Trockensediment innerhalb kurzer Zeit dieselbe Lebendkeimzahlhöhen wie beim Animpfen mit 10^6 N/g Trockensediment. Unabhängig von der Mikroorganismenkonzentration zu Versuchsstart liegt die maximal erreichte Endkeimzahl zwischen 10^7 und 10^8 N/g (7 und 8 log N/g) Trockensediment. Weder Kohlenwasserstoff- noch Stickstoff- und Phosphatzusatz konnten die Lebendkeimzahlhöhen darüber hinaus steigern. Die Keimzahlhöhen liegen im Labor bei den Statfjordöl-adaptierten Mikroorganismen durchschnittlich höher als vergleichsweise bei der natürlicherweise im Sediment vorkommenden Population (s. Abb. 22a und 22b). Gegen Versuchsende, ca. ab dem 30. Inkubationstag nähern sich die Lebendkeimzahlwerte den Werten der Statfjordöl-adaptierten Population an. Eine Steigerung der Kohlenwasserstoffabbau-geschwindigkeit konnte weder durch Öladaptation der Mikroorganismen noch durch Titererhöhung erreicht werden (s. Abb. 23a und 23b).

Hinsichtlich der Effektivität von Ölbekämpfungsstrategien, die den Einsatz von Dispergatoren auf Wattflächen vor-sehen, wurden in einem weiteren Abschnitt die Auswirkungen

von Kohlenwasserstoffzugaben im Vergleich zu Kohlenwasserstoff-Dispergator-Gemischen auf die Lebendkeimzahlen überprüft. Parallel dazu wurde verfolgt, ob die Dispergatorzugabe einen steigernden Effekt auf die Kohlenwasserstoffabbauraten hat. Dieser Versuchsansatz war vergleichbar mit bereits im Freiland durchgeführten Untersuchungen (s. Kap. 3.1.), jedoch wurde hier durch die Versuchsansätze das Sediment aerob gehalten sowie die Messungen im "geschlossenen" System durchgeführt. Die bereits bei den Felduntersuchungen verwendeten Dispergatoren wurden abermals eingesetzt: Corexit 9527, Metyrl OD und THL. Erneut wurde mit sterilisiertem Watt sowie Statfjordöl-adaptierten Mikroorganismen (Starttiter 10^7 N/g Trockensediment) gearbeitet.

Der Ansatz Öl- bzw. Hexadecan mit Nährstoffzusatz (N,P) (s. Abb. 24d) zeigt zu Versuchsbeginn, besonders beim Ölzusatz, ein leichtes Absinken der Lebendkeimzahlen (TCFU). Sie erholen sich aber rasch wieder und steigen bis auf ca. 5×10^8 N/g Trockensediment ($8,7 \log$ N/g) an.

Wie Abb. 24a-c zeigen, haben die Kombinationen Kohlenwasserstoff-Dispergator unterschiedliche Effekte auf die Lebendkeimzahlhöhen. Das Öl bzw. Hexadecan-Corexit 9527-Gemisch hat auf die Keimzahldichte einen negativeren Effekt als die Kohlenwasserstoffe allein, was sich durch einen Keimzahlabfall von 10^7 N/g auf ca. 10^5 N/g Trockensediment ($7 \log$ N/g - $5 \log$ N/g) zu Versuchsbeginn zeigt. Nach ca. 10 Tagen Inkubationszeit erholte sich die Population wieder und die Lebendkeimzahlen erreichen eine ähnliche Dichte wie bei der Kohlenwasserstoffzugabe allein. Der beobachtete hemmende und/oder toxische Effekt des Corexit 9527 war bereits ein Resultat der Freilanduntersuchungen, wurde also auch bei Laboruntersuchungen unter aeroben Bedingungen bestätigt. Ein ähnliches Ergebnis wie beim Corexit 9527 wurde mit den Versuchsansätzen der Kohlenwasserstoff-Metyrl OD-Gemische erzielt (s. Abb.

24b). Völlig anders verhielten sich die Lebendkeimzahlen bei den Kohlenwasserstoff-THL-Gemischen. Der Keimzahl-abfall zu Versuchsbeginn, besonders beim Rohöl allein beobachtet, wird unter THL-Einfluß aufgehoben. THL setzt somit sogar die Toxizität des Öls für die Mikroorganismen herab (s. Abb. 24c).

Betrachtet man nun parallel dazu die Resultate der Detergentienauswirkungen auf die Abbauraten, so lassen sich bei Hexadecan keine signifikanten Einflüsse der Dispergatoren feststellen (s. Abb. 25a). Ein scheinbar positiver Effekt von THL basiert nur auf einem Meßwert (s. Abb. 25a) und wird nicht für eine Aussage herangezogen. Beim Rohöl (s. Abb. 25b) wird der negative Effekt des Corexit 9527, dem Ölabbau entgegenzuwirken, deutlich (s. Kap. 3.1. und 4.1.). Weiterhin demonstrieren Abb. 25a und 25b mit ihren unteren Kurven einen geringen, aber signifikanten "natürlichen" Kohlenwasserstoffgehalt des Sediments. Ein Kohlenwasserstoffabbau ohne Zusatz von Mikroorganismen ist - wie erwartet - nicht vorhanden (s. Abb. 25a+b).

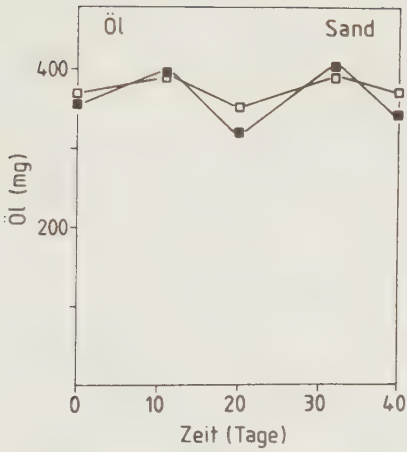


Abb. 21: Rohölabbau im Sandwatt, dargestellt als Verlauf der Ölkonzentration (mg/Standardansatz) über der Zeit. (-■-■-) Standardansatz mit Rohöl und Nährstoffen (N,P), (-□-□-) dasselbe ohne Nährstoffe (Kant et al., 1985).

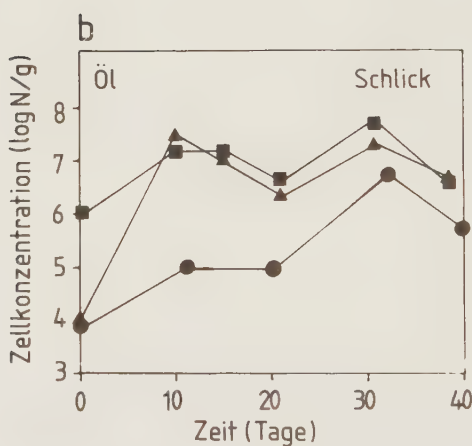
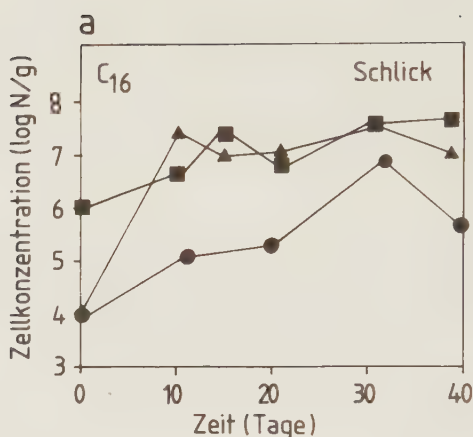


Abb. 22: Vergleich von Kurven der Abb. 18, die die Abhängigkeit der Kurvenverläufe von der Zellkonzentration zu Versuchsbeginn und der Vorbehandlung der Mikroorganismen demonstrieren. (●-●-) unbehandeltes, frisches Schlickwatt mit natürlicher Mikroorganismenpopulation; (▲-▲-) sterilisiertes Schlickwatt, angeimpft mit 10⁴ N/g Trockensediment; (■-■-) dasselbe, jedoch mit 10⁶ N/g Trockensediment beimpft. Standardansätze mit a) Hexadecan, b) Rohöl.

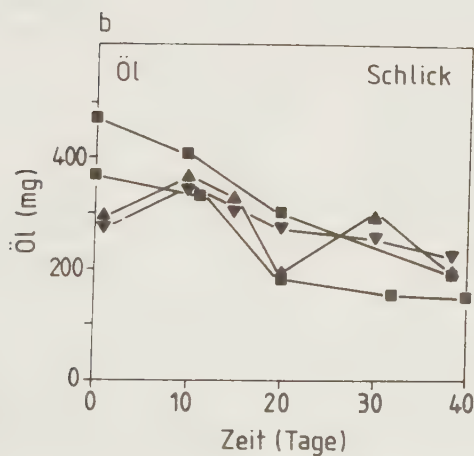
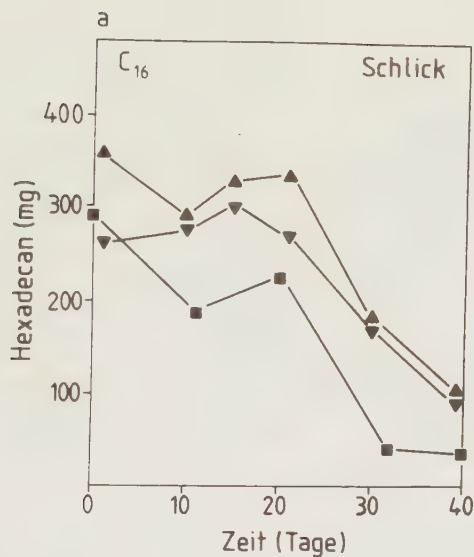


Abb. 23: Mikrobiologischer Kohlenwasserstoffabbau, dargestellt als Verlauf der Kohlenwasserstoff-Konzentration (mg/Standardansatz) über der Zeit. Unbehandeltes Schlickwatt (-■-■-); sterilisiertes Schlickwatt, angeimpft mit 10^6 (-▲-▲-) bzw. 10^4 (-▼-▼-) N/g Trockensediment. Standardansätze mit a) Hexadecan, b) Rohöl (Kant et al., 1985).

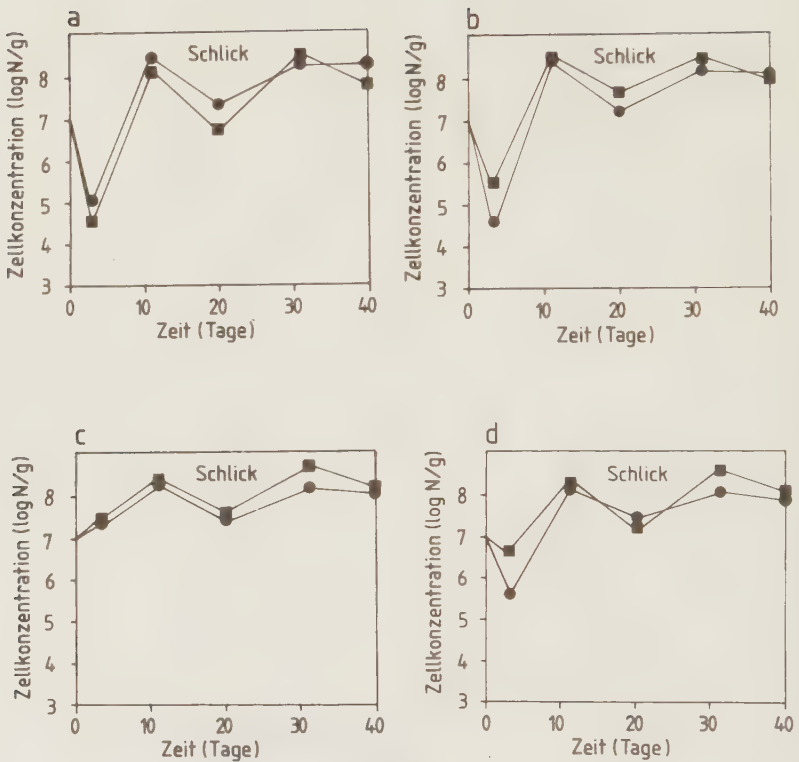


Abb. 24: Einflüsse von Kohlenwasserstoffen bzw. Kohlenwasserstoff-Dispergator-Gemischen auf die Entwicklung der Zellkonzentration (TCFU) im Schlickwatt. Standardansätze mit sterilisiertem Schlickwatt, beimpft mit 10^7 N/g Trockensediment. (-■-■-) Hexadecan, (-●-●-) Rohöl.

a) Kohlenwasserstoff-Corexit 9527-Gemisch,
b) Kohlenwasserstoff-Metryl OD-Gemisch,
c) Kohlenwasserstoff-THL-Gemisch,
d) Kohlenwasserstoffe ohne Dispergatorzusatz.

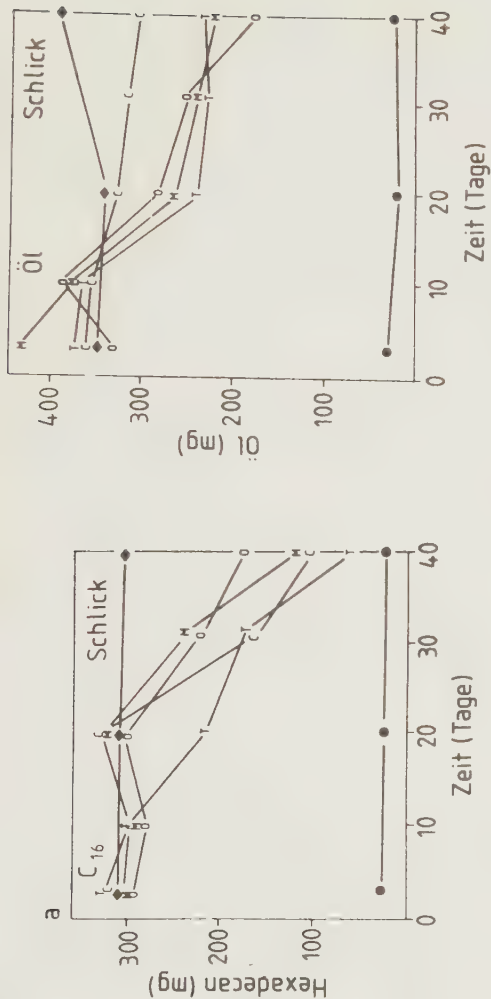


Abb. 25: Einflüsse von Dispergatoren auf den mikrobiologischen Kohlenwasserstoffabbau, dargestellt als Verlauf der Kohlenwasserstoff-Konzentration (mg/Standardansatz) über der Zeit im Schlickwatt unter Zusatz von Nährstoffen (N,P). (-o-o-) ohne Dispergatoren; (-c-c-) mit Corexit 9527; (-M-M-) mit Metryl OD; (-T-T-) mit THL; (-◆-◆-) sterilisiertes Watt mit Nährstoffen, ohne Dispergatoren, ohne Mikroorganismen; (-●-●-) ohne Kohlenwasserstoffe, ohne Mikroorganismen. Standardansätze mit sterilisiertem Schlickwatt, angeimpft mit 10^7 N/g Trockensediment. a) Hexadecan, b) Rohöl (Kant et al., 1985).

3.3. Untersuchungen zur Zerteilung von Mikroorganismen-Aggregaten sowie zur Abtrennung von Mikroorganismen von Sedimentpartikeln

Grundlegende Voraussetzung für Keimzahlbestimmungen ist, daß die zu bestimmenden Mikroorganismen vereinzelt vorliegen und von Partikeln wie Sediment, Detritus usw. abgetrennt werden. So kann z.B. bei der TCFU-Bestimmung auf Agarplatten die Ausbildung einer Kolonie sowohl von einem einzelnen Mikroorganismus als auch von einem Aggregat, das aus mehreren Mikroorganismen besteht, ausgehen. Unter natürlichen Bedingungen wie z.B. dem aquatischen Milieu sind aber stets an Partikel assoziierte Mikroorganismen und Organismenaggregate vorhanden.

Bereits 1959 führten Jones & Jannasch Untersuchungen zur Zerteilung von Bakterienaggregaten im Seewasser unter Einsatz verschiedener Konzentrationen der oberflächenaktiven Substanz TWEEN 80 durch. Für Keimzahlbestimmungen in Seewasser und marinen Sedimenten prüfte Gunkel (1964) die Verwendung eines Homogenisators (Ultra-Turrax) zur Abtrennung von Mikroorganismen bzw. zur Zerteilung von Aggregaten. Beck (1968) empfiehlt für die Abtrennung von Mikroorganismen aus Sedimenten die Behandlung mit 0,05 % (v/v) TWEEN 80.

Während der Freilandarbeiten (s. Abschnitt 3.1.) wurden die von uns hinsichtlich der Keimzahlen (TCFU) analysierten Sedimentproben in Anlehnung an die Methode von Krumbein et al. (1984) - basierend auf den oben erwähnten Untersuchungen von Gunkel (1964) - zur Abtrennung der Organismenaggregate mit Ultraschall behandelt (s. Abschnitt 2.5.4.). Zusätzlich wurden vergleichende Zerteilungs- bzw. Abtrennungstests mit Ultraschall und mit TWEEN 80 durchgeführt. Diese Untersuchungen hatten zum Ziel, den Arbeits- und Materialaufwand der Ultraschall-Methodik durch den Einsatz einer oberflächenaktiven Sub-

stanz zu reduzieren und die Eignung beider Methoden vergleichend zu überprüfen. Für die Keimzahlanalysen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Laboruntersuchungen zum mikrobiellen Kohlenwasserstoffabbau im Wattsediment (s. Abschnitt 3.2.) wurden die Sedimentproben infolgedessen anstelle von Ultraschall mit TWEEN 80 behandelt.

Die mikroorganismenablösende Wirkung von TWEEN 80 basiert auf der Reduzierung von Oberflächenspannungen. So wurde zunächst die reduzierende Wirkung von 0,05 bzw. 0,5 % (v/v) TWEEN 80 auf die Oberflächenspannung der Grenzfläche Luft/Flüssigkeit von Seewasser bzw. Luft/Suspension von Sediment-Seewasser-Gemischen (1:3, w/v) überprüft. Zum Einsatz kamen künstliches Seewasser und Sediment aus experimentell unbelastetem Wattbereich (Crildumer Siel) sowie Sediment aus experimentell ölkontaminierten Wattflächen (Vareler Watt; Höpner et al., 1985a). Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefaßt.

Es zeigte sich, daß die Oberflächenspannung (gemessen an der Grenzfläche Luft/Seewasser) nach Zugabe von 0,05 % (v/v) TWEEN 80 $0,045 \text{ Nm}^{-1}$ beträgt. Eine 10-fach erhöhte Zugabe der oberflächenaktiven Substanz erzielt keine weitere Reduktion. Anders dagegen verhält sich die Oberflächenspannung in Sediment-Seewasser-Suspension (1:3 w/v) nach Zufügen von TWEEN 80. Die Konzentration von 0,05 % TWEEN 80 reduzierte die Oberflächenspannung der Grenzfläche Luft/Sediment-Seewasser-Suspension je nach Sedimentprobe unterschiedlich stark. Unter Verwendung von Schlick aus dem Bereich Vareler Watt (ölkontaminiert) ergab sich eine Reduzierung der Oberflächenspannung auf $0,052 \text{ Nm}^{-1}$, bei Schlick vom Crildumer Siel (unkontaminiert) dagegen lediglich auf $0,062 \text{ Nm}^{-1}$. Erst die Zugabe von 0,5 % (v/v) TWEEN 80 erzielte bei beiden Sediment-Seewasser-Suspensionen eine einheitliche Oberflächenspannung von $0,044 \text{ Nm}^{-1}$, wie auch im Seewasser allein bereits durch Zufügen von 0,05 % TWEEN 80 erreicht wurde.

Der Einsatz von 0,5 % (v/v) TWEEN 80 bietet für beide Sediment-Seewasser-Gemische hinsichtlich der Oberflächenspannung und somit für die Abtrennung von Mikroorganismen von Sedimentpartikeln und für die Zerteilung von Mikroorganismen-Aggregaten gleiche Voraussetzungen. Die Möglichkeit der Entnahme repräsentativer Stichproben zur quantitativen Bestimmung von Mikroorganismen wäre gegeben.

Die Prüfung der Auswirkung der verschiedenen Abtrennungsmethoden (Ultraschall, 0,5 % TWEEN 80) auf die Höhe der Keimzahlen (TCFU) wurde mit Schlicksediment (Crildumer Siel) durchgeführt. Das Verfahren ist in Abschnitt 2.5.4. beschrieben. In Parallelansätzen fand dabei eine Behandlung des Sediment-Seewasser-Gemisches mit 0,5 % (v/v) TWEEN 80 und/oder Ultraschall statt. Als Kontrolle diente mit Seewasser versetztes Sediment, das lediglich mit dem Whirlmix homogenisiert wurde - im folgenden Text als "unbehandelt" bezeichnet.

Die Auswirkung der verschiedenen Behandlungsmethoden des Sediment-Seewasser-Gemisches auf die Anzahl gebildeter Kolonien ist in Tab. 7 zusammengefaßt.

Das Verhältnis der gebildeten Kolonien von behandeltem zu unbehandeltem Sediment zeigt für den Einsatz von 0,5 % (v/v) TWEEN 80 mit dem Wert 2,7 deutlich die beste Aggregatzerteilungs- bzw. Ablösewirkung. Ultraschallbehandlung allein erhöhte die Koloniezahlen in unserem Fall nur unwesentlich. Auch die Kombination TWEEN 80/Ultraschall war dem Einsatz von TWEEN 80 unterlegen. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Laboruntersuchungen wurde das für unsere Sedimentproben geeignete Ablöse- und Zerteilungsverfahren von Mikroorganismen, d.h. 0,5 % (v/v) TWEEN 80 eingesetzt.

Tab. 6: Auswirkung von zwei verschiedenen TWEEN 80-Konzentrationen (0,05 % bzw. 0,5 % v/v in künstlichem Seewasser) auf die Oberflächenspannung von Seewasser bzw. Sediment-Seewasser-Suspensionen (1:3; w/v), gemessen anhand der Abreißmethode (Kohlrausch, 1968) bei 20 °C an der Grenzfläche Luft/Flüssigkeit bzw. Suspension. Eingesetzte Sedimente waren experimentell ölkontaminiertes aus dem Vareler Watt und unkontaminiertes aus dem Wattbereich Crildumer Siel. Angegeben sind jeweils die arithmetischen Mittelwerte aus fünf Parallelmessungen.

Material	Oberflächenspannung in Nm ⁻¹		
	ohne TWEEN	0,05 % TWEEN	0,5 % TWEEN
Seewasser	(0,073-0,074) ¹⁾	0,045	0,044
Sediment-suspension (unkontaminiert)	0,068	0,062	0,044
Sediment-suspension (kontaminiert)	-	0,052	0,044

1) Literaturangabe für "normales" Seewasser (ZoBell, 1969)

Tab. 7: Effekt von 0,5 % (v/v) TWEEN 80 und/oder 30 sec. Ultraschall auf die Anzahl gebildeter Kolonien (TCFU) auf M₁K-Agar von Schlicksediment (Crildumer Siel). Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte von jeweils 10 Parallelen.

Behandlung	Anzahl der Kolonien pro Platte	Verhältnis von behandelt/ unbehandelt
unbehandelt	55	-
0,5 % TWEEN	151	2,7
0,5 % TWEEN Ultraschall	100	1,8
ohne TWEEN Ultraschall	61	1,1

3.4. Keimzahlbestimmung ölabbauender Mikroorganismen - Entwicklung und Problematik eines Bestimmungsver- fahrens

Bei der Ermittlung von Keimkonzentrationen ölhaltiger Medien und Sedimente wird in der Literatur immer wieder auf die Problematiken der verschiedenen Bestimmungsverfahren für ölabbauende Mikroorganismen hingewiesen (Gunkel, 1967; Walker & Colwell, 1976; Higashihara et al., 1978; Mills et al., 1978; Atlas, 1981; Floodgate, 1984 u.v.a.m.). Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit werden einige dieser Schwierigkeiten bei der Bestimmung ölabbauender Mikroorganismen aufgegriffen und ein weiteres Verfahren zur quantitativen Erfassung dargestellt.

3.4.1. Problematik der Lebendkeimzahlbestimmung (TCFU) ölabbauender Mikroorganismen mit Hilfe des Agarplatten-Verfahrens

Die Keimzahlen ölabbauender Mikroorganismen wurden zunächst anhand eines gängigen, die Lebendkeimzahl (TCFU) bestimmenden Verfahrens (Krumbein et al., 1980) auf ölhaltigem Agarmedium (M_2) ermittelt. Dieses Verfahren wurde bei den Analysen der Freilandarbeiten für die Testflächen 1.1. - 1.5. (Februar - Juli 1983) angewandt (s. Tab. 8). Bei der Bearbeitung der Probenahme 3 fielen auf fast allen inkubierten M_2 -Agarplatten im Bereich einiger Kolonien kleinere Einbuchtungen im Agar auf, die auf das Vorhandensein Agarose-verwertender Mikroorganismen hindeuteten. Dies würde bedeuten, daß diese zu Kolonien aufwachsenden Mikroorganismen den Agar als Kohlenstoffquelle nutzen und somit nicht zwingend zum Ölabbau fähig sind. Es stellten sich daher die Fragen, ob mit dem genannten Verfahren wirklich nur ölabbauende Mikroorganismen erfaßt werden oder zusätzlich zum Agar weitere C-Quellen genutzt werden. Um dies zu überprüfen, wurden zunächst bei der Bearbeitung der Sedimente der Probenahmen 4, 6 und 7 die Mikroorganismen parallel auf M_2 -Agarmedium mit Rohölzusatz als C-Quelle bzw. auf M_2 -Agarmedium ohne Rohöl, d.h. ohne C-Quelle, ausgeplattet (15 Sedimentproben mit jeweils 5 Parallelplatten), 21 Tage bei 18 °C inkubiert und die Lebendkeimzahl (TCFU) pro g Feuchtsediment ermittelt (s. Tab. 9). In 75 % aller Platten fanden wir auf ölfreiem Agar höhere Keimzahlen pro g Feuchtsediment als auf ölhaltigem, wobei auf ölfreiem Agar im Extremfall die Keimzahl sogar das 1,8-fache erreichte. Es ergab sich für alle Sedimentproben zusammengefaßt durchschnittlich 66 % höhere Lebendkeimzahlen (N/g Feuchtsediment) bei der Inkubation auf M_2 -Medium ohne Ölzusatz verglichen mit den Keimzahlen, die bei Inkubation auf M_2 -Medium mit Öl erzielt wurden. Für das Verfahren zur Bestimmung von Lebendkeimzahlen (TCFU) unter Verwendung von Öl/Agarmedien bedeutet dieses Ergeb-

nis, daß dabei im wesentlichen die Zahl der Mikroorganismen ermittelt werden kann, die in ihrem Wachstum keine Inhibition durch Öl erfahren.

Inhibitorische Effekte von Rohöl auf die Lebendkeimzahl von Mikroorganismen zeigten auch Untersuchungen von Higashihara et al. (1978). Die Zugabe von 1 % (v/v) Rohöl zum Agarmedium (0,01 % (w/v) Hefeextrakt enthaltend) ergab eine Reduzierung der Lebendkeimzahl von ca. 50 % verglichen mit den Lebendkeimzahlen, erzielt auf Medien ohne Rohöl. Bei Einsatz einer geringeren Menge Rohöl (0,2 %, v/v) reduzierte sich die Lebendkeimzahl lediglich um 11 %.

Diese ölpersistenten Mikroorganismen müssen aber nicht zwingend auch Öl als Kohlenstoffquelle nutzen können, was auch die Parallelinkubationen der Probenahmen 4, 6 und 7 aufzeigten. Auf dem M₂-Agarmedium ohne Öl als C-Quelle konnte sowohl eine Erhöhung der Zahl der Agarose-verwertenden (differenzierbar aufgrund der Einbuchtungen im Agar) als auch der Zahl der offenbar andere C-Quellen als Agarose nutzenden Mikroorganismen konstatiert werden. In weiteren Untersuchungen wurden daher systematisch zusätzliche zur Agarose bzw. zum Rohöl vorhandene Kohlenstoffquellen eliminiert.

Bei der Art der Aufarbeitung der Sedimentproben (Methode s. 2.5.4.) war die Übertragung von Sedimentpartikeln als zusätzliche Kohlenstoffquelle auf die Agarplatten nicht auszuschließen. Ebenso wenig konnte ausgeschlossen werden, daß durch das Verfahren mit auf die Agarplatte aufgebraachte Zellfragmente lysierter Mikroorganismen als C-Quelle dienten. Zur weitgehenden Reduzierung dieser Kohlenstoffquellen wurden die direkt ausplattierten, auf M₂-Agar gewachsenen Mikroorganismenkolonien (Inkubation: 14 d, 18 °C) auf M₂-Agar überstempelt, ebenfalls inkubiert und die Lebendkeimzahl (TCFU) pro g Feuchtsediment ermittelt (s. Tab. 10). Bezogen auf die TCFU der Direkt-

plattierung (100 %) war eine durchschnittliche Reduktion der Lebendkeimzahlen (TCFU) nach Überstempelung, d.h. nach weitgehendem Ausschluß der Sediment- bzw. Zellreste als C-Quellen, um 51 % festzustellen.

Eine weitere mögliche Kohlenstoffquelle waren Reste organischer Substanzen im natürlichen gealterten Seewasser. Durch die Verwendung künstlichen Seewassers (Levring, 1946) konnte auch diese C-Quelle ausgeschlossen werden. Bei Probenahme 8, wo erstmals künstliches Seewasser zur Sedimentaufarbeitung eingesetzt wurde, führte allein die Eliminierung dieser Kohlenstoffquelle zur Reduktion der Gesamtkeimzahlen um ca. eine Zehnerpotenz. Schloß man nun außer Öl sowohl die möglichen C-Quellen aus dem natürlichen Seewasser wie auch organischen Kohlenstoff aus Sediment- bzw. Zellresten durch Überstempelung auf M₂K-Agarplatten aus, so erhielt man winzige, auch mit 3-facher Vergrößerung nicht zählbar kleine Mikroorganismenkolonien.

Nach Elimination der drei Kohlenstoffquellen (natürliches Seewasser, Zellfragmente und Sedimentreste) war eine Ermittlung der Lebendkeimzahlen ölabbauender Mikroorganismen unter Verwendung des Agarplattenverfahrens aufgrund der Mikrokolonien nahezu unmöglich.

Bei den dargestellten Untersuchungen wurde trotz der Kenntnis des Vorhandenseins Agarose-verwertender Mikroorganismen, die stets erkennbar waren aufgrund der Einbuchtungen im Agar, weiterhin Agar als Verfestigungsmittel des Mediums eingesetzt. Bei der praktischen Anwendung des Agarplattenverfahrens ergibt sich, wie bei allen Keimzahlbestimmungsverfahren mit Hilfe von festen Ölmedien, das Problem des Kontaktes zwischen Mikroorganismen und Öl als Substrat. Um diesen Kontakt und die Anheftung der Mikroorganismen an Öltröpfchen als entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung und somit die Bestimmung der Zahl

ölabbauender Mikroorganismen zu gewährleisten, sollte bei Bestimmungen der Ölabbauerkeimzahlen von Festmedienverfahren abgesehen und statt dessen Flüssigmedien verwendet werden.

Tab. 8: Ölabbauerkeimzahlen (TCFU, angegeben in $N \times 10^3/g$ Feuchtsediment) der Wattsedimentproben von Februar bis Juli 1983 der Versuchsfelder 1.1. - 1.5. (M_2 -Agar). Angegeben sind jeweils die arithmetischen Mittelwerte von 5 Parallelen.

Versuchs- feld	Ölabbauerkeimzahlen (TCFU) in $N \times 10^3/g$ Feuchtsediment					
	Probenahme 1 (22.2.83)	Probenahme 3 (23.3.83)	Probenahme 4 (7.4.83)	Probenahme 5 (20.4.83)	Probenahme 6 (4.5.83)	Probenahme 7 (1.6.83)
1.1.	6,1	2,9	3,9	3,8	4,4	8,2
1.2.	5,9	3,4	1,7	4,7	5,4	3,6
1.3.	7,5	2,7	5,3	5,9	3,1	3,1
1.4.	5,2	4,0	4,0	2,0	3,0	3,7
1.5.	6,0	3,8	3,2	3,6	0,12	2,8

Versuchs- feld	Probenahme 4				Probenahme 6				Probenahme 7			
	N x 10 ³ /g Feuchtsed.		Zunahme der Keimzahlen (N/g) auf Agar ohne Öl in [%]		N x 10 ³ /g Feuchtsed.		Zunahme der Keimzahlen (N/g) auf Agar ohne Öl in [%]		N x 10 ³ /g Feuchtsed.		Zunahme der Keimzahlen (N/g) auf Agar ohne Öl in [%]	
	+ Öl	- Öl			+ Öl	- Öl			+ Öl	- Öl		
1.1.	3,9	4,3	11		4,4	7,9	80		8,2	8,6	5	
1.2.	1,7	2,1	25		5,4	7,5	38		3,6	6,0	67	
1.3.	5,3	5,1	(-4)		3,1	5,8	86		3,1	2,6	(-16)	
1.4.	4,0	6,7	67		3,0	8,4	180		3,7	5,4	45	
1.5.	3,2	3,4	7		-	-	-		2,8	7,8	180	
arithmetisches Mittel der Zunahme auf Agar ohne Öl [%]	28				96				74			

Tab. 9: Vergleich der Lebendkeimzahlen (TCFU, angegeben in N/g Feuchtsediment) auf Agarmedium-Platten (nach Krumbein et al., 1980) mit bzw. ohne Rohölzusatz (Arabian light) der Freilandprobenahmen 4 (7.4.83), 6 (4.5.83) und 7 (1.6.83). Arithmetische Mittelwerte aus jeweils 5 Parallelen.

Tab. 10: Lebendkeimzahl (TCFU) pro g Feuchtsediment auf ölhaltigem Agar (M₂-Medium) nach direkter Ausplattierung sowie nach Überstempelung auf M₂-Agar.

N x 10 ³ /g Feuchtsediment		Reduktion der
ausgeplattett	überstempelt	Kz. nach
		Überstempeln %
6,1	2,7	56
5,0	3,4	32
6,1	1,6	74
4,7	4,2	11
4,3	2,2	49
4,0	2,3	42
2,1	0,5	76
3,3	1,5	55
5,5	1,4	75
4,6	0,3	35
6,5	4,1	37
8,1	1,8	78
8,1	5,8	28
8,4	3,7	56
6,2	4,3	31
6,0	2,4	60
6,5	3,8	42
6,5	4,6	29
7,8	1,4	82
5,5	1,9	65
5,5	1,7	69
4,7	2,8	40
5,0	2,8	44
arithmetisches Mittel		51 %

3.4.2. Gesamtkeimzahlbestimmung ölabbauender Mikroorganismen unter Verwendung von Flüssigmedien bei Einsatz geringer Volumina (0,3 ml Testvol.) - Mikrotiterplatten - sowie 5 ml Testvolumen - Kulturröhrchen

Aufgrund der in Abschnitt 3.4.1. dargelegten Bedingungen zur Bestimmung von Ölabbauerkeimzahlen wurde zunächst ein prinzipiell auf der Most-probable-number-Technik (MPN) basierendes Flüssigkultur-Mikrotitertestverfahren geprüft. Dabei wurden Mikrotiterplatten Falcon 3072, Becton Dickinson Labware, Oxnard mit 96 Testgefäßen pro Platte und einer Füllkapazität von 0,4 ml je Testgefäß benutzt. In Analogie zur MPN sollte die Ölabbauerkeimzahl anhand der Medientrübung, bedingt durch das Wachstum von ölabbauenden Mikroorganismen in Medien mit Öl als alleiniger C-Quelle bestimmt werden. Das Mikrotiterverfahren hätte gegenüber der MPN-Technik mehrere Vorteile. Für die MPN-Technik gibt Oberzill (1967) beim Einsatz von 5 Röhrchen pro Verdünnungsstufe Konfidenzintervallsgrenzen ($\gamma = 95 \%$), transformiert in relative Werte bezogen auf das arithmetische Mittel, von 30 % bis 360 % an, in der sich der wahre Wert befindet. Der Einsatz von Mikrotiterplatten mit jeweils 96 Testnäpfchen (wells) pro Platte sowie die Reduzierung des für Keimzahlbestimmung eingesetzten Medienvolumens auf 0,3 ml pro well läßt eine Erhöhung der Ansätze zu. Das Resultat ist eine Einengung der Konfidenzintervallsgrenzen für die Ölabbauerkeimzahlen, innerhalb derer sich der wahre Wert bei 95 % statistischer Sicherheit befindet. Angestrebt war, die Prüfung einer Vielzahl von Parametern, wie z.B. unterschiedliche Detergenzien, Ölsorten bzw. Ölkonzentrationen und deren Einfluß auf die Ölabbauerkeimzahl unter Einsatz von Mikrotiterplatten zu ermöglichen.

Die folgenden Testläufe des Mikrotiterverfahrens dienten dazu, den Einsatz geringer Medienmengen zur Ermittlung von Keimzahlen auf der Basis auftretender Medientrübung durch Mikroorganismenwachstum zu überprüfen. Dazu wurden Mikroorganismensuspensionen unterschiedlicher, definierter Animpftiter (Einsatzmenge: 0,1 ml) zu 0,2 ml Medium pro well der Mikrotiterplatte pipettiert und inkubiert. Das Auftreten der Medientrübung bzw. die Trübungsstärke, bewirkt durch Organismenwachstum, wurde visuell registriert. Um bei der Registrierung der aufgetretenen Trübungen bzw. bei der Beurteilung und Differenzierung der Trübungsstärken unbeeinflusst von der Kenntnis der eingesetzten Titer arbeiten zu können, wurde die Beimpfung der Testnäpfchen nach einem verschlüsselten Pipettierschema durchgeführt. Die Auswertung erfolgte anhand der visuellen Reidentifizierung der Höhe des eingesetzten Mikroorganismen-titers durch die im Medium aufgetretenen Trübungsstärke, angegeben als Wiedererkennungquote (%).

Zum Einsatz kamen zunächst folgende Modellmikroorganismen: die Hefe *Saccharomyces* 2200, als Vertreter großzelliger Mikroorganismen, sowie zwei Bakterienarten: *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*. Zur Überprüfung der Differenzierbarkeit der wachstumsbedingten Medientrübungen mit *Saccharomyces* 2200 (Vorkultur s. 2.4.1.) wurde mit fünf verschiedenen Starttitern (2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 und 2×10^2 N/ml) pro Mikrotiterplatte gearbeitet, d.h. pro Platte und Verdünnungsstufe mindestens 18 parallele Ansätze. Als Wachstumsmedium wurde HVM verwendet; die Inkubationstemperatur betrug 30 °C.

Ausgehend von einer Generationszeit für *Saccharomyces* von $g = 2$ h konnte für den mittleren Starttiter 2×10^4 N/ml nach ca. 16 h Inkubationszeit mit einer Keimzahl von ca. 5×10^6 N/ml gerechnet werden. Bei Hefesuspensionen geht man davon aus, daß eine leichte, sichtbare Trübung bei einer Keimkonzentration von ca. 1×10^6 N/ml auftritt. Die

visuelle Reidentifizierung der durch Wachstum von *Saccharomyces* 2200 auftretenden Medientrübung fand nach 16 h Inkubation statt, also zu einem Zeitpunkt, an dem für den mittleren Starttiter mit einer leichten Medientrübung gerechnet werden konnte. Es war zu erwarten, daß die oberhalb bzw. unterhalb dieses Starttiters liegenden eingesetzten Mikroorganismenkonzentrationen hinsichtlich der auftretenden Medientrübung differenzierbar waren in: stark getrübt (Pelletbildung), mittlere Trübung bzw. kaum getrübt und klar. Es zeigte sich, daß die höchste eingesetzte Mikroorganismenkonzentration (2×10^6 N/ml) zu 40 % anhand der Trübungsstärke (z.T. als Pellet am Boden des Testnäpfchens) reidentifiziert werden konnte. Die Stärke der Medientrübungen der Starttiter 2×10^5 bzw. 2×10^4 N/ml waren nicht voneinander unterscheidbar. Dagegen lag die Wiedererkennungquote für die eingesetzten Hefetiter von 2×10^3 und 2×10^2 N/ml bei 100 %. Insgesamt konnte somit eine Wiedererkennungquote von 57 % erzielt werden. Diese Quote wäre sicherlich durch die Optimierung des Zeitpunktes für die visuelle Differenzierung der Medientrübungen zu verbessern gewesen. Da aber letztendlich das Mikrotiterverfahren hauptsächlich zur Keimzahlbestimmung von Bakterien verwendet werden sollte, wurde auf diese Optimierung bei *Saccharomyces* 2200 verzichtet.

Weitere Mikrotitertests wurden mit *E.coli* und *B.subtilis* (Vorkulturen s. 2.4.1.) wiederum unter Verwendung der Bakteriensuspensionen in fünf verschiedenen Starttitern (6×10^6 , 6×10^5 , 6×10^4 , 6×10^3 und 6×10^2 N/ml) in Nutrientmedium durchgeführt. Die Inkubationstemperatur betrug jeweils 30 °C. Aufgrund der unterschiedlichen Generationszeiten (g) der Bakterien variierten die zur Reidentifizierung gewählten Kontrollzeitpunkte entsprechend. Bei *E.coli* (g = 20 min) war für die mittlere eingesetzte Bakterienkonzentration nach einer Inkubationszeit von ca. 200 min eine Keimzahl von ca. 5×10^7 N/ml zu erwarten. Um den optimalen Zeitpunkt für die Reidentifi-

zierung der Starttiter aufgrund der Trübungsstärke zu erfassen, fanden Kontrollen nach 180, 200 und 220 min statt. Für die mittlere eingesetzte Bakterienkonzentration der *B.subtilis*-Suspension war nach einer Inkubationszeit von ca. 400 min eine als leichte Trübung sichtbare Bakterienkonzentration zu erwarten. Kontrollen der Trübungsstärke wurden hier nach 360, 400 und 440 min durchgeführt.

Sowohl bei *E.coli* als auch bei *B.subtilis* konnten lediglich die geringsten eingesetzten Starttiter (Trüfungsbewertungen: klar bis kaum getrübt) reidentifiziert werden. Die Wiedererkennungsquote lag dabei bei 100 %. Eine weitere Differenzierung der durch Bakterienwachstum bewirkten Medientrübung in: stark getrübt (Pellet), mittlere Trübung oder leicht getrübt war nicht möglich. Zum erfolgreichen Einsatz des Mikrotiterverfahrens auf der Basis der MPN-Technik würde dies genügen, da keine Differenzierung von Trübungsstärken, sondern lediglich von trüben (bewachsenen) oder klaren (unbewachsenen) Medien notwendig ist.

Um die Eignung des Mikrotitertestverfahrens zur Keimzahlbestimmung ölabbauender Mikroorganismen zu überprüfen, wurden Wattmischpopulation (WAK I, s. 2.4.2.) sowie als n-Alkanabbauende Modellorganismen *Pseudomonas aeruginosa* und *Bacillus coagulans* (Vorkulturen s. 2.4.1.) verwendet. Inkubationsmedien waren ölhaltige Medien mit und ohne Zusatz des Emulgators TM-Hüls (M_2K bzw. M_2K-E). TM-Hüls ist ein mikrobiell nicht abbaubarer, untoxischer Emulgator (Gunkel, 1974) und somit für die Dispergierung von Ölen geeignet. Die Mikroorganismensuspensionen wurden in fünf verschiedenen Titern (entsprechend der Starttiter von *E.coli* bzw. *B.coagulans*) eingesetzt. Die Inkubationstemperatur betrug für die Modellorganismen 37 °C, für die Wattmikroorganismen 18 °C. Kontrollen zur Reidentifikation fanden zunächst über 24 h in 6 stündigen, später täglich - für die Wattmischpopulation über 21 Tage - statt.

Die relativ hohe Inkubationstemperatur bei den Mikrotiter-tests mit *B.coagulans* und *P.aeruginosa* bzw. das langsame Wachstum von Mikroorganismen im Ölmedium mit der daraus resultierenden langen Inkubationsdauer ergaben das Problem der Verdunstung des Mediums vor Auftreten von Wachstums-trübung. Dies konnte auch durch Erhöhung der Luftfeuchtigkeit in den Inkubationsräumen nicht verhindert werden. Zum anderen führte der zur Dispergierung des Rohöls eingesetzte Emulgator TM-Hüls selbst zu einer Trübung des Mediums, was die Ermittlung von Trübungen, bedingt durch Mikroorganismenwachstum, verfälschte. Eine Dispergierung des Öls wäre damit nur auf mechanischem Wege, d.h. durch Schütteln möglich. Bedingt durch das geringe Volumen der Testnäpfchen sowie der Adhäsionskräfte zwischen Medium und dem Material der Mikrotiterplatten konnte keine Durchmischung erreicht werden. Somit war ein für das Wachstum von ölabbauenden Mikroorganismen notwendiger Kontakt zwischen dem Substrat, d.h. dem Rohöl, und den Mikroorganismen nicht ausreichend gewährleistet. Von einer Verwendung des Mikrotiterplattenverfahrens zur Ermittlung der Keimzahl ölabbauender Mikroorganismen mußte daher abgesehen werden.

Aufgrund der beschriebenen Problematik wurde das Testvolumen zur Bestimmung der Keimzahl ölabbauender Mikroorganismen auf 5 ml erhöht und anstatt von Mikrotiterplatten Pyrexröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 10 ml verwendet. Wie bereits in den vorangegangenen Versuchen kamen ölhaltige Medien mit bzw. ohne Zusatz des Emulgators TM-Hüls (M_2K bzw. M_2K-E) zum Einsatz. Die Zellsuspensionen der Modellorganismen *Pseudomonas aeruginosa* sowie *Bacillus coagulans* hatten beim Kulturstart einen Titer von jeweils 3×10^6 N/ml. Die Inkubation erfolgte über 21 Tage bei $37^\circ C$, 90 rpm. Die mechanische Dispergierung des Öls konnte als befriedigend bewertet werden und führte bei Zusatz des Emulgators sogar zur Mikrotröpfchenbildung des Öls. Das Bakterienwachstum wurde anhand der auftretenden Medien-

trübung qualitativ nachgewiesen (Methode s. 2.5.6.). eingesetzt wurde eine Konzentration der Bakteriensuspensionen. Wäre dies bei Einsatz von 5 ml Testvolumen erfolgreich, könnte das Verfahren durch Erhöhung der Parallelansätze sowie durch Verwendung von Zehnerverdünnungsstufen in ein qualitatives Verfahren entsprechend der MPN-Technik umgewandelt werden. Vorteile wie die Einengung der Konfidenzintervalle bezüglich der Ölabbauerkeimzahlen oder die Möglichkeit der gleichzeitigen Überprüfung verschiedener Einflußfaktoren auf das Wachstum ölabbauender Mikroorganismen, die das Mikrotitertestverfahren hätte bieten können, blieben auch bei einem Testvolumen von 5 ml weitestgehend erhalten.

Die Resultate des qualitativen Nachweises zeigten ein gravierendes Problem auf. Der Emulgator TM-Hüls führte auch hier, bedingt durch die von ihm bewirkte Opaleszenz des Mediums, zu Verfälschungen der Erkennung von Medien-trübungen durch Bakterienwachstum. Trotz der hervorragenden emulgatorischen Eigenschaften von TM-Hüls mußte daher von einem weiteren Einsatz zur Bestimmung von Keimzahlen auf Basis von Medien-trübung abgesehen werden. Als weiteres Problem bei der Erkennung von bakterienwachstumsbedingten Medien-trübungen erwies sich das Öl selbst. Mit zunehmender Vermehrung der ölabbauenden Bakterien wird das Öl durch die Mikroorganismen selbst emulgiert. Diese Emulgation führte nach längerer Inkubationsdauer letztendlich zu einer zunehmenden Trübung bzw. bräunlichen Anfärbung des Inkubationsmediums und verhinderte damit eine präzise Erkennung wachstumsbedingter Medien-trübungen. Es muß also ein Verfahren entwickelt werden, daß es ermöglicht, das Öl zu separieren. Weiterführende Untersuchungen dazu sind ab Abschnitt 3.4.3. zu finden.

3.4.2.1. Erfassung der Gesamtkeimzahl ölabbauender Mikroorganismen in Flüssigkultur mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie

Eine Möglichkeit zur Erfassung der Gesamtzahl von Mikroorganismen in ölhaltigen Medien ist die Zählung der Keime im Fluoreszenzmikroskop. Unter der Bedingung, daß sich die Mikroorganismen von Öltröpfchen durch Eigenfluoreszenz oder nach Anfärbung mit einem geeigneten Fluoreszenzfarbstoff unterscheiden, wäre dies ein Verfahren, bei dem Ölrreste nicht stören und an Öl assoziierte Bakterien mit-erfaßt würden.

Es war geplant, unter Einsatz der Epifluoreszenz-Filtertechnik und der Direktzählung der Bakterien (Hobbie et al., 1977; Pettipher et al., 1982 und Pettipher et al., 1983) die Gesamtkeimzahl der ölabbauenden Mikroorganismen nach entsprechender Vorinkubation in Ölmedien zu bestimmen. Zunächst wurde jedoch geprüft, ob die Eigenfluoreszenz der Mikroorganismen zur Unterscheidung von Öltröpfchen ausreicht. Fluoreszenzmessungen wurden unter Verwendung von Suspensionen der Modellorganismen *Pseudomonas aeruginosa* und *Bacillus coagulans* in nicht-ölhaltigem Medium (M₂K, ohne Ölzusatz) durchgeführt. Bei einer Excitation von 390 nm wurde das Fluoreszenzspektrum im Wellenlängenbereich von 200 und 800 nm gefahren. Die eingesetzten Bakterien zeigten im Bereich von 450 bis 520 nm eine geringe Eigenfluoreszenz, die aber derart schwach war, daß auf entsprechende Messungen im ölhaltigen Medium verzichtet wurde. Für weitere Versuche wurden die Mikroorganismen zur Verstärkung der Fluoreszenz mit dem Farbstoff Acridinorange gefärbt. Nach Ermittlung optimaler Farbstoffkonzentration und Einwirkzeit auf hitzefixierte Präparate (ohne den Einsatz von Ölmedien) von *B.coagulans* sowie Wattmikroorganismen (WAK I) konnten differenzierte fluoreszenzmikroskopische Bilder erzielt werden (Methode hierzu s. 2.5.3.). Fluoreszenzmikroskopische Unter-

suchungen anhand von gefärbten hitzefixierten Präparaten von Wattmikroorganismen (in M₂K-Medium vorinkubiert) waren ebenso erfolgreich. Die Bakterien waren trotz der Ölreste im Präparat fluoreszenzmikroskopisch gut vom Öl unterscheidbar. Lebendgefärbte Präparate (Methode s. 2.5.3.) waren aufgrund der nur schwachen oder unvollständigen Färbung der Bakterienzellen durch Acridinorange für die Fluoreszenzmikroskopie ungeeignet.

Da die Bedingung der Unterscheidbarkeit von Bakterienzellen und Öl durch die Färbung mit Acridinorange erfüllt war und störende Einflüsse wie die Eigenfluoreszenz des Öls (Zeeck, 1980) nicht beobachtet wurden, wäre die Fluoreszenzmikroskopie verbunden mit der Direktzählung eine optimale Möglichkeit zur Bestimmung von ölabbauenden Mikroorganismen. Voraussetzung für die Verwendung dieses Verfahrens ist der Einsatz einer durch Membranfilter gefilterten definierten Menge bakterienhaltiger Suspension, die auf dem Filterpapier angefärbt und mit Hilfe des Epifluoreszenzmikroskops und der oben zitierten Technik ausgewertet wird. Verwendet wurden Satorius-Membran-Filter SM 130, Satorius GmbH, Göttingen. Von der eingesetzten bakterien- und ölhaltigen Suspension blieben bei der Filtration Ölreste an den Wänden der Kulturröhrchen, in der bei der Filtration verwendeten Spritze sowie im Filtergehäuse haften. Unter Kenntnis der Assoziation der Mikroorganismen an die Öloberfläche konnten durch dieses Verfahren keine die Keimzahl in der eingesetzten Bakteriensuspension repräsentierenden Werte erwartet werden. Ein Verfahren zur Abtrennung des Öls von der Bakteriensuspension war somit auch hier zur Elimination der oben genannten Fehlerquelle unumgänglich.

3.4.3. Überprüfung der Eignung eines Lösungsmittels zur Trennung von Öl aus wässriger bzw. wässriger mikroorganismenhaltiger Suspension und Biotrockenmassebestimmung (BTM)

Bei Verfahren zur Bestimmung von Mikroorganismen in wässrigen ölhaltigen Medien wirkten sich Ölreste stets störend auf die Präzision bzw. Durchführbarkeit dieser Verfahren aus (z.B. Biomassebestimmung, turbidimetrische und MPN-Verfahren). Als weiteres Problem erwies sich die beim Ölabbau stattfindende und notwendige Assoziation der Mikroorganismen an die Öloberfläche. In wässrigen Ölmedien besiedeln die Bakterien die Grenzfläche des auf dem Medium schwimmenden Öls und bilden dort z.T. sogar sichtbare weiße Filme (Gunkel, 1967; Floodgate, 1984; eigene Beobachtungen). Bei ausreichend großer Öloberfläche bzw. niedrigen Keimzahlen kann dies zu einer Situation führen, in der sich fast die gesamten Bakterien an der Öl-Grenzfläche assoziiert befinden. Diese an Öl assoziierten Mikroorganismen entziehen sich Bestimmungsmethoden, die allein unter Verwendung des wässrigen Teils des Mediums durchgeführt werden (z.B. MPN- und Lebendkeimzahlbestimmungsverfahren). Aufgrund der genannten Problematik wurde versucht, das Öl durch ein geeignetes Lösungsmittel aus dem wässrigen Medium zu entfernen und möglichst gleichzeitig an Öl assoziierte Bakterien abzutrennen.

Zunächst wurde die Eignung verschiedener Lösungsmittel zur Abtrennung des Öls vom wässrigen Teil des Mediums in Abwesenheit von Mikroorganismen anhand folgender Testansätze überprüft: 4 ml M_2K -Medium mit unterschiedlichen Mengen Lösungsmittel: 1,5; 2,5; 5; 7; 10; 15; 20 und 30 % (v/v). Nach guter Durchmischung (Whirlmix) wurde das Absetzen der Öl/Lösungsmittel-Phase beobachtet und die Trennung der organischen und wässrigen Phase bewertet. Es zeigte sich, daß durch die Zugabe von Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) eine Abtrennung des Öls von der wässrigen Phase erzielt werden

konnte. Als ideale Dosierung wurde die Zugabe von 10 % (v/v) CCl_4 zum Ölmedium ermittelt. Bei dieser Konzentration sank das Öl rasch auf den Boden des Teströhrchens ab. Am Reagenzglasrand verbleibende Öls Spuren konnten durch vorsichtiges Whirlen ebenfalls in die CCl_4 -Phase überführt werden. Im Reagenzglas lagen somit zwei deutlich erkennbare Fraktionen vor: oben die wässrige Phase des eingesetzten Mediums (in späteren Versuchen die Mikroorganismen enthaltend), unten die organische Öl/ CCl_4 -Phase (s. Abb. 26).

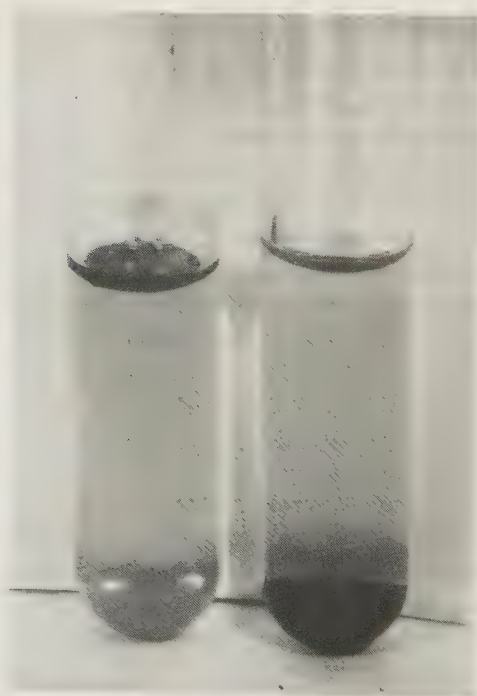


Abb. 26: Abtrennung des Öls durch 10 % (v/v) Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4). Linkes Röhrchen: M_2K -Medium, enthaltend 1 % (v/v) Statfjordöl. Rechtes Röhrchen: dasselbe Medium nach Einsatz von CCl_4 .

Als nächstes wurde die Fähigkeit von CCl_4 zur Phasentrennung unter Anwesenheit von Mikroorganismen sowie die Auswirkung des Lösungsmittels auf die Bakterienzellen untersucht. Hierfür wurden zum einen Modellorganismen (*Pseudomonas aeruginosa* und *Bacillus coagulans*; n-Alkanabbauer), zum anderen Wattmischpopulation (WAK I) verwendet. Die Versuche fanden parallel in zwei Ansätzen in Pyrexröhrchen statt:

1. mit ölfreiem bakterienhaltigen,
2. mit ölhaltigem bakterienhaltigen Medium (M_2K).

Testserie 1 enthielt künstliches Seewasser plus Bakterien-suspension (*P.aeruginosa*, *B.coagulans* bzw. Wattmikroorganismen; Titer: ca. 10^7 N/ml) mit einem Gesamtvolumen von 5 ml pro Röhrchen. Unter Zugabe von 10 % (v/v) CCl_4 fand eine Phasentrennung auch bei Anwesenheit von Mikroorganismen einwandfrei statt. In den der Lösungsmittelphase entnommenen Proben konnten mikroskopisch keine Bakterien festgestellt werden. Auswirkungen des Lösungsmittels auf die Bakterien (Proben der wässrigen Phase), wie etwa Lysis oder Deformierung der Zellen, konnten nach lichtmikroskopischer Überprüfung (1250 fache Vergrößerung) nicht gefunden werden.

Die zweite Testserie fand parallel zum Ansatz 1 allerdings unter Verwendung eines Ölmediums (M_2K) statt. Zusätzlich wurden die Mikroorganismen durch Vorinkubation ans Ölmedium adaptiert. Damit sich die jeweils eingesetzten Mikroorganismen ans Öl assoziieren konnten, wurden die Kulturen vor Zugabe von CCl_4 zusätzlich inkubiert (48 h, 90 rpm, 37 °C bei Einsatz der Modellorganismen, 30 °C bei Wattmikroorganismen). Die Phasentrennung durch die CCl_4 -Behandlung erfolgte ebenso problemlos wie im ölfreien Medium. Mikroskopische Kontrollen sowie auch die Überprüfung mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) zeigten, daß auch unter diesen Bedingungen die eingesetzten Mikroorganismen nicht geschädigt wurden (s. Abb. 27 und Abb. 28). In den Proben der ölhaltigen organischen Phase

wurden mikroskopisch keine bzw. nur wenige Bakterien gefunden. Dieser zweite Test wies auch daraufhin, daß unter Verwendung von CCl_4 zur Abtrennung des Öls die Assoziation der Mikroorganismen an die Öloberfläche gelöst werden konnte, ein Problem, auf das bereits von Gunkel (1967) sowie in dieser Arbeit bei der Keimzahlbestimmung in Flüssigmedien in Abschnitt 3.4.2. hingewiesen wurde. Nach diesen Tests ist CCl_4 zur Abtrennung von Ölen aus wässrigen bakterienhaltigen Medien als geeignet anzusehen.

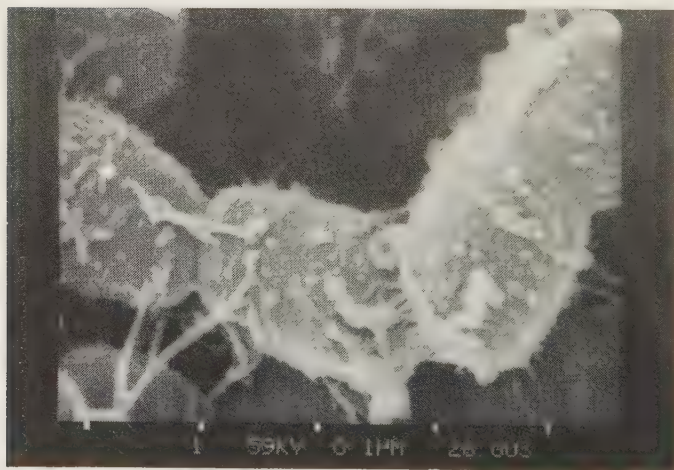


Abb. 27: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Ausschnitts eines Bakterienfilaments (Wattmischpopulation WAK I) ohne den Einsatz von Tetrachlorkohlenstoff.



Abb. 28: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Ausschnitts eines Bakterienfilaments (Wattmischpopulation WAK I, 48 h in M_2K -Medium inkubiert) nach Abtrennung des Öls durch 10 % (v/v) Tetrachlorkohlenstoff.

Da die Lösungsmittelzugabe die Bakterienzellen äußerlich nicht veränderte, wurde die Vermehrungsfähigkeit der Bakterien nach CCl_4 -Behandlung überprüft. Verwendet wurden Wattmikroorganismen (WAK I). Zunächst wurden in künstlichem Seewasser suspendierte Mikroorganismenzellen mit und ohne CCl_4 -Behandlung auf M_1K -Agar ausgeplattet und inkubiert (21 d, 18 °C). Der Anteil der gebildeten Kolonien betrug, bezogen auf die Kolonienzahl vor der CCl_4 -Behandlung, nach CCl_4 noch 36 %. Weitere Testreihen dienten zur Überprüfung des Einflusses der Kombination von Öl und CCl_4 auf die Vermehrungsfähigkeit von Wattbakterien. Nach der Behandlung mit CCl_4 waren lediglich 3 % der eingesetzten Mikroorganismen zur Koloniebildung fähig, d.h. vermehrungsfähig. Daraus läßt sich schließen, daß die kombinierte Wirkung von Öl plus CCl_4 die Vermehrungsfähigkeit der Mikroorganismen stärker beeinflusst

als das Lösungsmittel allein. Die Möglichkeit, nach Einsatz von CCl_4 ermittelte Gesamtkeimzahlen in Vermehrungsfähige (Lebendkeimzahl) und Vermehrungsunfähige durch Ausplattieren auf geeigneten Nährmedien zu differenzieren, entfiel damit.

Die Biotrockenmasse (BTM) ist indirekt als ein Maß für die Zahl der gesamten Mikroorganismen anzusehen. Daher wurde überprüft, ob eine BTM-Bestimmung nach Abtrennung des Öls aus wässriger mikroorganismenhaltiger Suspension durch CCl_4 möglich ist. Dazu wurden *Bacillus coagulans*-Suspensionen in ölhaltigem Medium (M_2K) mit folgenden Titern eingesetzt: 10^7 , 10^6 , 10^5 und 10^4 N/ml. Das Gesamtvolumen betrug 5 ml pro Teströhrchen. Nach der Abtrennung des Öls mit 10 % (v/v) CCl_4 wurde die wässrige bakterienhaltige Phase entnommen, das Medium abfiltriert und die BTM der eingesetzten Bakterien bestimmt. Für korrekte BTM-Bestimmungen ist es unerlässlich, den gesamten Überstand zu verwenden. Dabei ergab sich das Problem des Abpipettierens der wässrigen bakterienhaltigen Phase, ohne Öl oder Lösungsmittel mitzureißen. Geringe Anteile des Öls gelangten bei vollständiger Entnahme des Überstandes mit den Bakterien letztendlich auf die Filterplättchen und verfälschten die Werte der Biotrockenmasse. Keimzahlbestimmungsmethoden unter der Bedingung der vollständigen Entnahme der wässrigen bakterienhaltigen Phase waren somit ungeeignet.

3.4.4. Analyse möglicher Einflüsse von Tetrachlorkohlenstoff auf die Gesamtkeimzahlbestimmung in ölhaltigen Medien

Zusammengefaßt resultieren aus den in Abschnitt 3.4.3. dargestellten Tests für den Einsatz von 10 % (v/v) CCl_4 folgende Ergebnisse:

- Eine Abtrennung des Öls von der wässrigen Phase erfolgte ohne und bei Anwesenheit von Mikroorganismen einwandfrei.

- Der Einsatz von 10 % (v/v) CCl_4 bewirkte weder Lyse noch Veränderung der Zellform der eingesetzten Mikroorganismen.
- An Öl assoziierte Bakterien wurden durch CCl_4 vom Öl getrennt.

Die Verwendung von 10 % (v/v) CCl_4 ist für die Bestimmung von Bakterienkonzentrationen in ölhaltigen Medien somit prinzipiell geeignet. Da eine vollständige und ölfreie Entnahme des wässrigen bakterienhaltigen Überstandes nicht möglich war, konnten keine reproduzierbaren Biotrockenmassebestimmungen durchgeführt werden (s. Abschnitt 3.4.3.). Aliquote des wässrigen Überstandes ließen sich dagegen in den meisten Fällen problemlos entnehmen, so daß es, auch entsprechend der oben genannten Ergebnisse, nahelag, die Bakterienkonzentrationen mit Hilfe turbidimetrischer (Optische Dichte-Messung) bzw. mikroskopischer (Bakterienzählkammer) Verfahren zu ermitteln. Die Anwendbarkeit dieser Verfahren unter Verwendung ölhaltiger Medien und Einsatz von CCl_4 wurden anhand von Versuchsserien geprüft und statistisch¹⁾ ausgewertet. Die Klärung folgender Fragen stand dabei im Vordergrund:

- Ist nach der Behandlung mit CCl_4 die Bestimmung von Keimkonzentrationen durch die oben genannten Verfahren möglich und reproduzierbar?
- Haben unterschiedliche Ölsorten bzw. -konzentrationen oder Medienzusammensetzungen Einfluß auf die Methoden?

Für die Versuchsserien, die zur Klärung der ersten Frage dienten, wurden Wattanreicherungskulturen (WAK I) verwendet. Jeder Ansatz bestand aus 5 ml Ölmedium (M_2K) plus 0,5 ml der Anreicherungskultur (1×10^8 N/ml). Nach Ausschütteln des Öls mit 10 % (v/v) CCl_4 wurden ca. 2/3 des

1) Grundlagen zu den statistischen Berechnungen sind in Kreyszig (1977), Sachs (1984) sowie Hartung et al. (1982) zu finden.

Überstandes abpipettiert und die optische Dichte (OD) sowie die Keimzahl mit Hilfe der Zählkammer bestimmt. Die Messungen eines Spektrums (400-900 nm) des verwendeten Mediums ergab, daß M_2K im für die Bestimmung der optischen Dichte gewählten Bereichs (E_{550}) kein Absorptionsmaximum aufweist. Verwendet wurde das Spektralphotometer 550 S, Perkin-Elmer, Überlingen.

Bei der Überprüfung des Einflusses von Resten des Lösungsmittels auf die Bestimmung der Bakterienkonzentration mit Hilfe der Zählkammer zeigte sich zunächst, daß in einigen Fällen CCl_4 -Tröpfchen mikroskopisch sichtbar waren. Eine Verfälschung der Zählwerte durch Verwechslung der Bakterienzellen mit CCl_4 -Tröpfchen ist jedoch nicht zu befürchten, da sich die Lösungsmitteltröpfchen durch ein völlig unterschiedliches optisches Verhalten auszeichnen. Im Gegensatz zu Bakterienzellen sind die CCl_4 -Tröpfchen stets kreisrund mit überzogen kontrastreichen Rändern. Bei Phasenkontrasteinstellung weisen die Oberflächen der CCl_4 -Tröpfchen schwarze konzentrische Ringe auf, ein Phänomen, das bei Bakterien nicht auftritt.

In aus den entsprechenden Überständen entnommenen Aliquots (Ansätze s.o.) konnten hinsichtlich der optischen Dichtemessung keine grundsätzlich störenden CCl_4 -Reste festgestellt werden. Dies konnte auch anhand der statistischen Auswertung einer Reihe von Meßwerten (ohne Mikroorganismen), die mit verschiedenen Medien bzw. Lösungen angesetzt wurden, bestätigt werden. Verwendet wurden künstliches Seewasser, Seewasser-SV und physiologische NaCl, versetzt mit jeweils 1 % (v/v) Statfjordöl und behandelt mit 10 % (v/v) CCl_4 . Die optische Dichte (E_{550}) wurde sowohl vor als auch nach CCl_4 -Behandlung gemessen und verglichen (s. Tab. 11).

Tab. 11: Einfluß von Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) auf die turbidimetrische Messung nach der Abtrennung von Öl aus Seewasser, Seewasser-SV und physiologischer Kochsalzlösung. Vor CCl_4 : E_{550} Meßwerte ohne Einfluß von Öl bzw. CCl_4 . Nach CCl_4 : E_{550} Meßwerte nach Abtrennung von zugefügtem Statfjordöl (1 %) durch 10 % CCl_4 .

Seewasser		Seewasser-SV		Physiol. NaCl	
vor CCl_4	nach CCl_4	vor CCl_4	nach CCl_4	vor CCl_4	nach CCl_4
E_{550}	E_{550}	E_{550}	E_{550}	E_{550}	E_{550}
0,046	0,048	0,046	0,046	0,043	0,044
0,045	0,046	0,046	0,047	0,044	0,045
0,045	0,047	0,046	0,047	0,044	0,045
0,046	0,047	0,045	0,047	0,044	0,045
0,045	0,046	0,045	0,047	0,044	0,045
0,045	0,047			0,044	0,045
0,045	0,048			0,044	0,045
0,045	0,047			0,044	0,045
0,046	0,049			0,044	0,045
0,045	0,048			0,044	0,045
0,045	0,047			0,044	0,045
0,046	0,047			0,044	0,046
0,045	0,048			0,044	0,046
0,045	0,047			0,044	0,046
0,045	0,047			0,044	0,046
0,046	0,047			0,044	0,046
0,046	0,047			0,044	0,046
0,046	0,048			0,044	0,046
0,046	0,048			0,045	0,046

Beim verdünnten künstlichen Seewasser lagen die OD-Meßwerte nach CCl_4 bei einem arithmetischen Mittel ($\bar{x}$) von 0,047 durchschnittlich um 0,002 höher als vor der CCl_4 -Behandlung. Die Prüfung der Auswirkung von CCl_4 bei der Verwendung von Seewasser-SV ($\bar{x} = 0,047$) bzw. physiologischer NaCl ($\bar{x} = 0,045$) ergab jeweils eine durchschnittliche Erhöhung der OD-Werte um 0,001 nach Behandlung mit CCl_4 .

Bei den für die obigen Aussagen zugrundeliegenden Daten handelt es sich um paarweise angeordnete Meßwerte (vor CCl_4 ; nach CCl_4) mit unabhängigen Differenzen aus Zufallsstichproben. Geprüft werden sollte nun die Frage, ob sich durch den Einsatz von CCl_4 ein signifikanter Unterschied in Form einer Erhöhung der optischen Dichte nach der CCl_4 -Behandlung zeigt. Trotz Kenntnis, daß die Differenzen der OD-Meßwerte (d_i) nicht normalverteilt sind, wurden t-Tests mit der Nullhypothese $H_0: \mu_d = 0$ gegen die Alternativhypothese $H_A: \mu_d \neq 0$ auf dem Signifikanzniveau von 5 % auf Prüfung des arithmetischen Mittelwertes der Paardifferenzen auf Null durchgeführt. Die Schätzwerte für die Test-Statistik wurden nach folgender Beziehung ermittelt:

$$t = \frac{\frac{(\sum d_i)}{n}}{\sqrt{\frac{\sum d_i^2 - \frac{(\sum d_i)^2}{n}}{n(n-1)}}} \quad \text{mit FG} = n - 1.$$

n ist der Stichprobenumfang.

Für verdünntes künstliches Seewasser ergab sich anhand der t-Verteilung für $t = 11,19 \gg t_{18,0,05,\text{zweiseitig}} = 2,101$. Entsprechend ergaben sich für die Testreihen bezüglich der Auswirkung von CCl_4 unter Verwendung von Seewasser-SV $t = 3,209 \gg t_{4,0,05,\text{zweiseitig}} = 2,776$ bzw. bei Verwendung von physiologischer NaCl $t = 12,5 \gg t_{19,0,05,\text{zweiseitig}} = 2,093$. Auf dem Signifikanzniveau von 5 % sind die Nullhypothesen somit zu verwerfen. Dies ergab sich auch bei

Überprüfung der Meßdaten anhand des verteilungsfreien Wilcoxon-Tests für Paardifferenzen (Sachs, 1984). Der von CCl_4 bewirkte Unterschied der OD-Meßwerte ist also in allen drei Fällen auf dem 5 % Niveau statistisch signifikant. Ob sich nun diese Erhöhung der Meßwerte der optischen Dichte durch den Einsatz von CCl_4 letztendlich auf die turbidimetrische Bestimmung von Keimzahlen auswirkt, wurde in weiteren Experimenten mit Bakteriensuspensionen getestet (s. Abschnitt 3.4.5.).

Um die Ölsortenabhängigkeit der turbidimetrischen Messungen bei Einsatz von CCl_4 zu prüfen, wurde alternativ 1 % (v/v) Arabian light bzw. Statfjordöl verwendet. Die Testansätze fanden unter Verwendung von Wattmikroorganismen (WAK I; Ausgangstiter 1×10^8 N/ml) in unterschiedlichen Konzentrationen bzw. Verdünnungsstufen statt: 1×10^8 N/ml $\hat{=}$ 1,0; 4×10^7 N/ml $\hat{=}$ 0,4; 2×10^7 N/ml $\hat{=}$ 0,2; $1,3 \times 10^7$ N/ml $\hat{=}$ 0,13 und 1×10^7 N/ml $\hat{=}$ 0,1.

Die optische Dichte (ΔE_{550}) wurde jeweils nach Abtrennung des Öls durch CCl_4 gemessen (s. Abb. 29). Die durchschnittlichen Abweichungen der ΔE_{550} -Meßwerte der verschiedenen Ölsorten voneinander betrug ± 7 %, ein Wert, der der Schwankungsbreite der parallelen Meßwerte entsprach. Das bedeutet, daß das Verfahren der Erfassung von Mikroorganismenkonzentrationen durch turbidimetrische Messung nach Einsatz von CCl_4 für die Klasse der leichten Öle (Arabian light, Statfjordöl) unabhängig ist. Hier zeigte sich auch bereits, daß die bei der Prüfung der Medien- bzw. Lösungsabhängigkeit gefundene Erhöhung der ΔE_{550} -Meßwerte innerhalb der Schwankungsbreite der Messungen "verschwand".

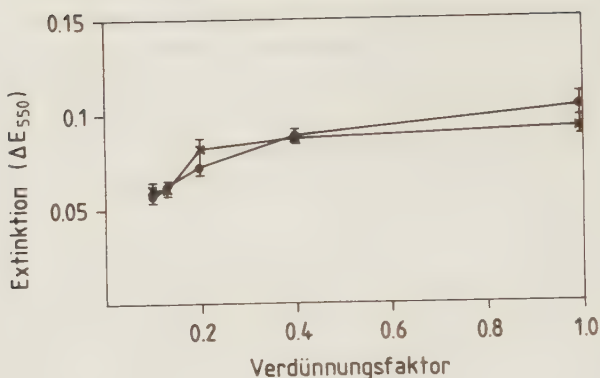


Abb. 29: Einfluß verschiedener Ölsorten (1 %, v/v) auf die Extinktion (ΔE_{550} nm) bei der turbidimetrischen Erfassung von Keimkonzentrationen (WAK I) in Seewasser nach Abtrennung des Öls durch CCl_4 . Arithmetische Mittelwerte (Statfjordöl ●, Arabian light x) und Abweichung vom Mittelwert (± 7 %).

Als Weiteres galt nun zu klären, ob unterschiedliche Ölkonzentrationen die turbidimetrische Messung nach Verwendung von 10 % CCl_4 (v/v) beeinflussen bzw. ob die Dosierung des Lösungsmittels auch noch bei höheren Ölkonzentrationen ausreichte. Wattmikroorganismensuspension (WAK I) mit Titer 5×10^7 N/ml und 5×10^6 N/ml wurden hierzu mit alternativ 0,5 %; 1 % bzw. 10 % (v/v) Statfjordöl versetzt. Die nach der Behandlung mit CCl_4 gemessenen ΔE_{550} -Werte ergaben, daß die Unterschiede zwischen den Meßdaten, bezogen auf die verschiedenen Ölkonzentrationen, im gleichen Umfang lagen, wie die Schwankungsbreiten der Parallelwerte eines Konzentrationsansatzes (s. Tab. 12). Ein Einfluß auf die turbidi-

metrischen Messungen durch CCl_4 Reste im wässrigen Überstand war also auch bei Einsatz geringerer Ölmengen (0,5 %) nicht zu befürchten. Gleichzeitig zeigte sich, daß die Dosierung des Lösungsmittels CCl_4 ausreichte, größere Ölmengen (10 %) optimal von der wässrigen bakterienhaltigen Phase zu trennen.

Tab. 12: Einfluß verschiedener Ölkonzentrationen (Statfjord; 0,5; 1,0 und 10 % (v/v) auf die Extinktion (ΔE_{550}) bei der turbidimetrischen Erfassung von Keimkonzentrationen (WAK I) in M_2K -Medium nach Abtrennung des Öls durch CCl_4 .

ölkonzentration	ΔE_{550} -Meßwerte						MSb* der Parallelwerte in %
0,5 %	0,091	0,097	0,104	0,090	0,084	0,093	19
1 %	0,098	0,100	0,102	0,093	0,100	0,090	12
10 %	0,093	0,099	0,092	0,097	0,097	0,090	9

MSb* bei
verschied.
ölkonz.
in %

7 3 12 7 16 3

*MSb = Maximale Schwankungsbreite der ΔE -Meßwerte

3.4.5. Statistische Analytik des Einflusses von Tetrachlorkohlenstoff auf die turbidimetrische bzw. mikroskopische (Zählkammer) Bestimmung von Mikroorganismen in ölhaltigen Medien

Nach Prüfung der prinzipiellen Eignung des Einsatzes von CCl_4 zur Keimzahlbestimmung in ölhaltigen Medien (s. Abschnitt 3.4.4.) wurden mit Hilfe umfangreicher Testreihen folgende Fragestellungen ausführlicher untersucht:

- Welchen Einfluß hat die CCl_4 -Behandlung auf die turbidimetrische Bestimmung von Mikroorganismen?
- Welchen Einfluß hat sie auf die mikroskopische Erfassung?
- Besteht auch nach der Behandlung mit CCl_4 ein linearer Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der optischen Dichtemessung und den Keimzahlen, ermittelt durch die Zählung mittels Zählkammer?

Für die hier zugrundeliegenden Versuche wurden Wattmischpopulationen (WAK I; Titer: 10^8 N/ml) in 5 verschiedenen Verdünnungen (1,0; 0,4; 0,2; 0,13 und 0,1) in künstlichem Seewasser verwendet und die optische Dichte sowie die Keimzahl mit Hilfe der Zählkammer zunächst vor CCl_4 -Behandlung bestimmt. Parallel dazu wurden die Mikroorganismensuspensionen (Titer s.o.) in künstlichem Seewasser plus 1 % (v/v) Statfjordöl zur Abtrennung des Öls mit 10 % (v/v) CCl_4 behandelt und im Aliquot des wässrigen bakterienhaltigen Überstandes die optische Dichte sowie die Keimzahl ermittelt (nach CCl_4). Gemessen wurde im Bereich einer Mikroorganismenkonzentration von ca. 1×10^7 bis ca. 1×10^8 N/ml und im Bereich der optischen Dichte von $E_{550} = 0,05$ bis 0,5. Die Anzahl der Parallelmessungen wurde im üblichen Rahmen gehalten: drei Parallelen bei turbidimetrischen Bestimmungen und sechs Parallelwerte bei Bestimmungen mit der Zählkammer. Die Mittelwerte solcher Parallelmessungen sind in den Graphiken dargestellt bzw. liegen den folgenden Berechnungen zugrunde. Für die statistische Auswertung der Daten zur Bestimmung von

Schätzwerten für die Standardabweichung und von Konfidenzintervallen wurden alle Meßwerte aus Parallelmessungen herangezogen. Für die folgenden Auswertungen sowie die statistischen Analysen wurden die Meßdaten von vier Versuchsreihen, die jeweils fünf Verdünnungsstufen mit entsprechenden Parallelwerten (s.o.) enthalten, herangezogen.

Um die Trübungsmeßwerte (ΔE) bzw. die Daten der Zählung (N/ml) der Bakteriensuspensionen vor und nach CCl_4 vergleichen zu können, wurden die Werte der unbehandelten Proben (vor CCl_4) gleich 100 % gesetzt und die Werte nach CCl_4 -Behandlung entsprechend in % errechnet (s. Tab. 13). Bei den turbidimetrischen Messungen zeigte sich, daß die Verwendung von CCl_4 zur Abtrennung des Öls von der wässrigen bakterienhaltigen Phase durchschnittlich 2 % Erniedrigung der optischen Dichte bewirkte. Es kamen allerdings Werte vor, die extrem höher als 100 % lagen, die bei der Berechnung unberücksichtigt blieben. Sie waren eindeutig das Resultat von mitgerissenen CCl_4 -Resten beim Abpipettieren des Überstandes (s. Tab. 13, Vers.1, Spalte 2). Dieser Fehler konnte auf ein Minimum reduziert werden, wenn im Zweifelsfalle statt 2/3 nur 1/2 der wässrigen Phase abpipettiert wurde.

Betrachtet man nun den Einfluß von CCl_4 auf die mit Hilfe der Zählkammer ermittelten N/ml, findet man nach CCl_4 durchschnittlich 91 % der vorgegebenen Bakterienkonzentration wieder. Extremwerte liegen hier bei 74 % bzw. 108 %. Der Verlust nach CCl_4 -Behandlung von 26 % ist darauf zurückzuführen, daß auch trotz vorsichtigen Hinzutropfens des Lösungsmittels im Einzelfall Mikroorganismen mit in die Öl/ CCl_4 -Phase gerissen wurden. Dies bestätigten auch mikroskopische Kontrollen, die in solchen Fällen vermehrt Mikroorganismen in der Öl/ CCl_4 -Phase erkennen ließen.

Tab. 13: Prozentualer Anteil der Meßwerte der Keimzahlen per Zählkammer (N/ml) und der optischen Dichte (ΔE_{550}) nach Behandlung mit 10 % (v/v) CCl_4 . (vor CCl_4 = 100 %).

Versuch	N/ml (%)	ΔE_{550} (%)
1	90	107
	87	114
	74	151
	81	140
	94	124
2	88	95
	79	98
	85	74
	103	100
	77	106
3	101	100
	100	101
	92	102
	87	100
	107	92
4	93	97
	97	102
	88	96
	90	102
	108	100
arithm.	91	98
Mittel		(ohne Vers.1)

Zur differenzierteren Beurteilung bzw. zur Beschreibung der Variabilität der Meßwerte für N/ml und ΔE_{550} vor und nach CCl_4 wurden Schätzwerte für die Standardabweichung (s) der Parallelmessungen dieser Parameter berechnet und daraus Konfidenzintervalle für den Mittelwert bei normalverteilt-

ter Grundgesamtheit geschätzt. Diese Verteilungshypothese wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests (Shapiro & Wilk, 1965), der insbesondere bei geringem Stichprobenumfang geeignet ist, exemplarisch geprüft. Danach war in fast allen Fällen die Nullhypothese der Normalverteilung sowohl für die Zufallsvariable X (optische Dichte, N/ml) als auch für die Zufallsvariable Y (Mikroorganismenkonzentration, N/ml) nicht zu verwerfen. Dementsprechend wurden auf der Grundlage aller Parallelmessungen Schätzwerte für die Standardabweichungen sowie für die Konfidenzintervalle berechnet. Für die Standardabweichungen (s) wurden die erwartungstreuen Schätzer:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n-1}} \quad \text{bzw.} \quad s_x = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{gewählt, wobei}$$

$\bar{x}$ bzw. $\bar{y}$ das arithmetische Mittel der x - bzw. y -Werte und n den Stichprobenumfang bedeuten.

Zur Konfidenzzahl $\gamma = 95\%$ wurde bei unbekannter Varianz als Konfidenzintervall für den Erwartungswert der

Y-Variablen (μ_y):

Konf $\{\bar{y} - a \leq \mu_y \leq \bar{y} + a\}$ mit $a = \frac{s_y}{\sqrt{n}} \cdot t(n-1); \frac{1}{2}(1+\gamma)$
bzw. für den Erwartungswert der X-Variablen (μ_x):

Konf $\{\bar{x} - b \leq \mu_x \leq \bar{x} + b\}$ mit $b = \frac{s_x}{\sqrt{n}} \cdot t(n-1); \frac{1}{2}(1+\gamma)$
ermittelt.

Die Konfidenzintervalle ($\gamma = 95\%$) für den Erwartungswert von Y_v (N/ml , vor CCl_4 -Behandlung) bzw. Y_w (N/ml , nach CCl_4 -Behandlung) sind in Abb. 30a und Abb. 30b dargestellt. Aus dem optischen Vergleich dieser Intervalle ist ersichtlich, daß im gewählten Bereich der Mikroorganismenkonzentration von 1×10^7 bis 1×10^8 N/ml die CCl_4 -Anwendung geringen Einfluß auf die beobachteten Meßwerte und die resultierende Standardabweichung für

Parallelwerte hat. Das Intervall zum Mittelwert 1.6×10^7 (7,2 log) N/ml wird dabei als Ausnahmefall angesehen. Das größte Konfidenzintervall vor CCl_4 hat eine Länge von $4,8 \times 10^7$ N/ml bei einem arithmetischen Mittel von $6,3 \times 10^7$ (7,8 log) N/ml. Daraus folgt, daß der wahre Wert μ_{YV} mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % von dem Konfidenzintervall $\text{Konf}\{3,9 \times 10^7$ (7,59 log) N/ml; $8,7 \times 10^7$ (7,94 log) N/ml} überdeckt wird. Transformiert man zu Vergleichszwecken diese Grenzen der Konfidenzintervalle auf relative Werte bezogen auf das jeweilige arithmetische Mittel, läßt sich, ausgehend von dem Konfidenzintervall maximaler Länge, konstatieren, daß der Erwartungswert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % zwischen 62 % und 138 % liegt.

Nach der Behandlung mit CCl_4 findet man das größte Konfidenzintervall mit einer Länge von $1,4 \times 10^7$ N/ml bei einem arithmetischen Mittel von $1,5 \times 10^7$ (7,17 log) N/ml. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % wird der wahre Wert μ_{YN} somit von dem Konfidenzintervall $\text{Konf}\{0,8 \times 10^7$ (6,9 log) N/ml; $2,2 \times 10^7$ (7,34 log) N/ml} überdeckt. Geht man auch hier vom Konfidenzintervall maximaler Länge aus und transformiert die Grenzen der Konfidenzintervalle auf relative Werte bezogen auf das jeweilige arithmetische Mittel, läßt sich entsprechend für den Erwartungswert μ_{YN} aussagen, daß er mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % zwischen 53 % und 147 % liegt.

Abb. 30a

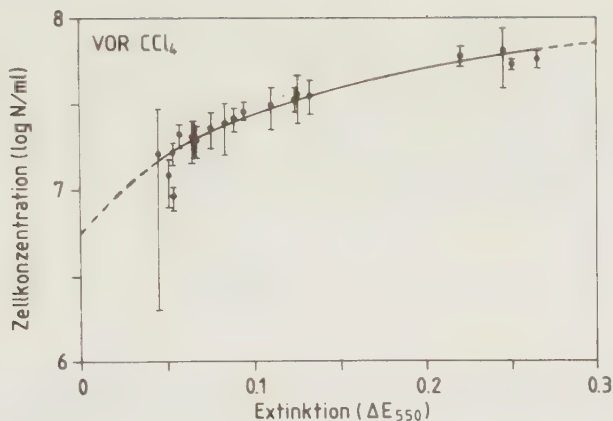


Abb. 30b

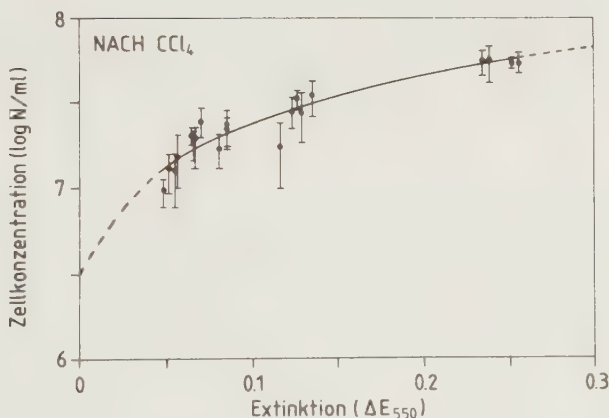


Abb. 30: Zusammenhang zwischen Zellkonzentration ($\log N/\text{ml}$) und Extinktion (ΔE_{550}) - Darstellung der arithmetischen Mittel der Parallelmessungen der Bestimmung der Mikroorganismenkonzentration (Zählkammerzählung), der Konfidenzintervalle ($\gamma = 0,95$) für den Erwartungswert von Y_V (N/ml , vor CCl_4) bzw. von Y_N (N/ml , nach CCl_4) und der Regressionsgeraden für $\hat{y}$ (Darstellung nach logarithmischer Transformation) vor (Abb. 30a) bzw. nach der Behandlung mit CCl_4 (Abb. 30b).

Die hier zugrundeliegenden 4 Versuchsreihen sind als Parallelen zueinander konzipiert und Stichproben gleichen Umfangs mit Daten aus gleicher Grundgesamtheit. Eine Zusammenfassung der Varianzen (s^2) und damit der Standardabweichungen (s) dieser Versuchsreihen zu s^{*2} bzw. s^* ist durch lineare Transformation wie folgt möglich:

$$s^{*2} = \frac{1}{4^2} (s_1^2 + s_2^2 + s_3^2 + s_4^2) .$$

Unter Verwendung der Standardabweichungen $s^{*}_{\cdot v}$ bzw. $s^{*}_{\cdot N}$ und der arithmetischen Mittel der Mikroorganismenkonzentration bzw. der optischen Dichtemessung der Versuchsreihen wurden die Konfidenzintervalle ($\gamma = 95\%$) für die Erwartungswerte geschätzt (Kreyszig, 1977). Für die Mikroorganismenkonzentrationen der Versuchsreihen erhält man vor CCl_4 - bzw. nach CCl_4 -Behandlung Standardabweichungen, die nur unwesentlich voneinander abweichen: $s^{*}_{\cdot v}$ (vor CCl_4) = 4×10^6 und $s^{*}_{\cdot N}$ (nach CCl_4) = $2,9 \times 10^6$.

Vor der CCl_4 -Behandlung ergibt sich bei einem arithmetischen Mittel der entsprechenden Versuchsreihen von 3×10^7 N/ml, daß der wahre Wert $\mu_{\cdot v}$ mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % vom Konfidenzintervall $\text{Konf}\{2,4 \times 10^7 (7,4 \log) \text{ N/ml}; 3,6 \times 10^7 (7,6 \log) \text{ N/ml}\}$ überdeckt wird. Nach der Behandlung mit CCl_4 ergibt sich bei einem arithmetischen Mittel der entsprechenden Versuchsreihen von $2,7 \times 10^7$ N/ml, daß der wahre Wert $\mu_{\cdot N}$ vom Konfidenzintervall $\text{Konf}\{2,2 \times 10^7 (7,3 \log) \text{ N/ml}; 3,2 \times 10^7 (7,5 \log) \text{ N/ml}\}$ überdeckt wird ($\gamma = 95\%$). Transformiert man diese Konfidenzintervallsgrenzen (vor bzw. nach CCl_4) in relative Werte bezogen auf das jeweilige arithmetische Mittel aus den Versuchsreihen, läßt sich konstatieren, daß der Erwartungswert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % zwischen 80 % und 120 % (vor CCl_4) bzw. zwischen 81 % und 119 % (nach CCl_4) liegt. Bezieht man nun diese relativen

Abweichungen vom arithmetischen Mittel der Versuchsreihen vor bzw. nach CCl_4 -Behandlung auf das Volumen eines Großquadrats ($0,0008 \text{ mm}^3$) der verwendeten Zählkammer, so ergibt sich vor CCl_4 -Behandlung ein Zählfehler von ± 5 Keimen pro Großquadrat bei Einsatz von $3 \times 10^7 \text{ N/ml}$ ($\cong 24 \text{ N/Großquadrat}$) bzw. nach CCl_4 ein Fehler von ± 4 Keimen pro Großquadrat bei Einsatz von $2,7 \times 10^7$ ($\cong 22 \text{ N/Großquadrat}$). Dies ist sicherlich als typischer und tolerierbarer Zählfehler bei der Bestimmung von Mikroorganismenkonzentrationen zu bewerten.

Es handelt sich insgesamt betrachtet sowohl vor als auch nach CCl_4 -Behandlung hinsichtlich der Keimzahlbestimmung um geringe Standardabweichungen der parallel gemessenen Werte und damit auch um Konfidenzintervalle geringer Länge. Die Bestimmung von in diesem Sinne "vertrauenswürdigen" Daten für Bakterienkonzentrationen (N/ml) mit Hilfe der Zählkammer ist also auch nach Abtrennung von Öl durch CCl_4 gewährleistet.

Als weiteres galt es nun zu klären, wie sich CCl_4 auf die Präzision der turbidimetrischen Messungen von Keimzahlen auswirkt. Die Mittelwerte der entsprechenden Daten mit den zugehörigen Konfidenzintervallen sind in Abb. 31a und Abb. 31b dargestellt.

Abb. 31a

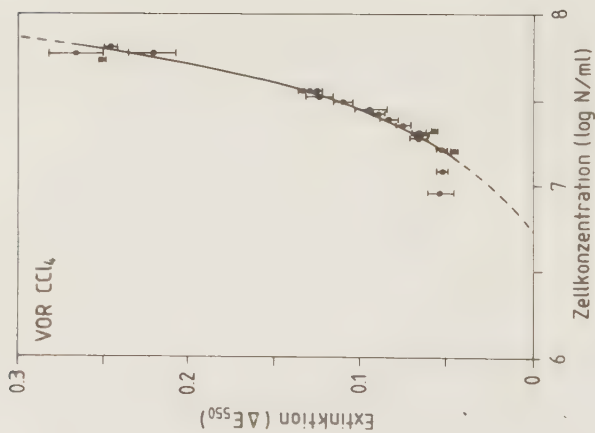


Abb. 31b

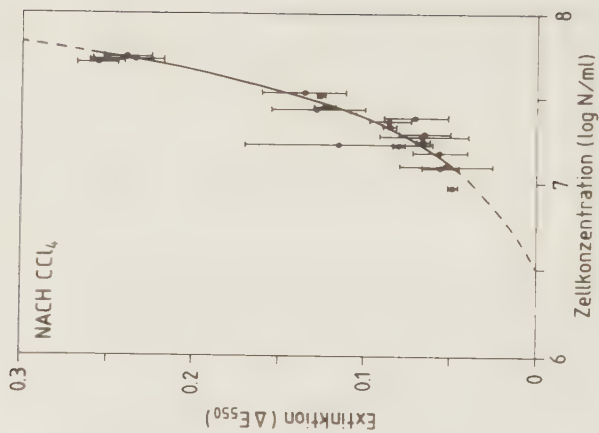


Abb. 31: Zusammenhang zwischen Extinktion (ΔE_{550}) und der Zellkonzentration (log N/ml) - Darstellung der arithmetischen Mittel der Parallelmessungen der Bestimmung der Mikroorganismenkonzentration (Zählkammerzählung), der Konfidenzintervalle ($\gamma = 0,95$) für den Erwartungswert von X_v (N/ml, vor CCl_4) bzw. X_n (N/ml, nach CCl_4) und der Regressionsgeraden für γ (Darstellung nach logarithmischer Transformation) vor (Abb. 31a) bzw. nach der Behandlung mit CCl_4 (Abb. 31b).

Die Länge der Konfidenzintervalle zu $\gamma = 95\%$ sind für die Messungen der optischen Dichte im üblichen Bereich von $\Delta E_{550} = 0,05$ bis $0,3$ erwartungsgemäß gering und für die Daten vor CCl_4 -Behandlung über den gesamten Meßbereich recht einheitlich. Die Konfidenzintervalle ($\gamma = 95\%$) der turbidimetrischen Meßdaten nach CCl_4 weisen allerdings größere Längen auf verglichen mit denen vor CCl_4 . Dies machen auch die Standardabweichungen der Versuchsreihen-zusammenfassung deutlich: Für die ΔE_{550} -Werte vor CCl_4 erhält man $s_{xv}^* = 0,0013$, für die Werte nach CCl_4 eine ca. drei Mal höhere Standardabweichung von $s_{xN}^* = 0,004$. Bezogen auf den Mittelwert der optischen Dichtemessungen der Versuchsreihen vor CCl_4 -Behandlung ($0,114 \Delta E$) wird der wahre Wert μ_{xv} mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% vom Konfidenzintervall $\text{Konf}\{0,112 \Delta E; 0,116 \Delta E\}$ überdeckt. Bezogen auf den Mittelwert der optischen Dichtemessung der Versuchsreihen nach CCl_4 -Behandlung ($0,117 \Delta E$) wird der wahre Wert μ_{xN} vom Konfidenzintervall $\text{Konf}\{0,111 \Delta E; 0,123 \Delta E\}$ überdeckt. Nach Transformation dieser Grenzen der Konfidenzintervalle (vor bzw. nach CCl_4) in relative Werte bezüglich des jeweiligen arithmetischen Mittels der entsprechenden Versuchsreihen, ergibt sich, daß der Erwartungswert ($\gamma = 95\%$) vor CCl_4 zwischen 98% und 102% bzw. nach CCl_4 zwischen 95% und 105% liegt. Der Bereich, in dem sich der wahre Wert für ΔE_{550} mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% befindet, ist also um $\pm 3\%$ größer verglichen mit dem Bereich vor CCl_4 -Behandlung. Wie bereits erwähnt, sind nach der Behandlung mit CCl_4 Reste des Lösungsmittels im bakterienhaltigen Überstand zwar weitgehend, aber nicht vollständig auszuschließen.

Die turbidimetrischen Meßdaten erstrecken sich über einen Bereich von $0,05$ bis $0,3 \Delta E_{550}$. Da die Konfidenzintervalle über diesen Bereich unterschiedliche Längen aufweisen, liegt es nahe, den Einfluß von CCl_4 -Resten auf die Konfidenzintervalle der arithmetischen Mittel der Meßwerte der optischen Dichte in definierten Meßgrenzen zu unter-

suchen. Die arithmetischen Mittel der ΔE_{550} -Messungen dreier Parallelen mit den Konfidenzintervallen ($\gamma = 95\%$) bezüglich der jeweiligen arithmetischen Mittel wurden dazu in Gruppen der Größe 0,05 ΔE zusammengefaßt und das Verhältnis zueinander in % anhand des Quotienten der Länge des Konfidenzintervalls zum jeweiligen arithmetischen Mittel errechnet (s. Tab. 14). Wie zu erwarten, zeigte sich, daß der Einfluß von CCl_4 -Resten bei Messungen im Bereich von 0,05 bis 0,1 ΔE_{550} am stärksten war: der Anteil der Länge der Konfidenzintervalle vom jeweiligen arithmetischen Mittel beträgt durchschnittlich 44 %. Betrachtet man innerhalb dieser Gruppe die Daten für ΔE_{550} zwischen 0,05 und 0,06 getrennt, also den Grenzbereich der optischen Dichte-Messungen, so erhält man sogar einen Anteil der Länge der Konfidenzintervalle vom jeweiligen arithmetischen Mittel von durchschnittlich 68 %. In den Meßbereichen 0,2 bis 0,25 ΔE_{550} bzw. 0,25 bis 0,3 ΔE_{550} betrugen die Länge der Konfidenzintervalle bezogen auf die entsprechenden arithmetischen Mittel mit 14 % bzw. 9 % nur noch das 0,3- bzw. 0,2-fache des entsprechenden Wertes des Bereichs von 0,05 bis 0,1 ΔE_{550} . Zusammengefaßt kann für den Meßbereich von 0,2 bis 0,3 ΔE_{550} ein Anteil der Längen der Konfidenzintervalle vom jeweiligen arithmetischen Mittel von durchschnittlich 11 % angegeben werden. Eventuell vorhandene Reste von CCl_4 z.B. haben also in diesem Meßbereich den geringsten Einfluß auf die Genauigkeit der optischen Dichte-Messungen. Dagegen ist der Meßbereich zwischen 0,05 und 0,1 ΔE_{550} am anfälligsten für Störungen durch CCl_4 .

ΔE_{550} Meßbereich	arithmetisches Mittel ΔE_{550}	Konfidenzintervalle ($\gamma = 0,95$)	Länge des Konf.intervalls bezogen auf den Mittelwert [%] ($LK/\bar{x}$)	Arithm. Mittel der kualen ($LK/\bar{x}$)-Werte
0,05	0,052	$\pm 0,0273$	105	68
	0,056	$\pm 0,0110$	39	
	0,056	$\pm 0,0164$	59	
bis	0,065	$\pm 0,0150$	46	44
	0,066	$\pm 0,0266$	81	
0,10	0,066	$\pm 0,0040$	12	34
	0,070	$\pm 0,0190$	54	
	0,080	$\pm 0,0029$	7	
	0,085	$\pm 0,0035$	8	
	0,085	$\pm 0,0124$	29	
0,10 bis	0,115	$\pm 0,0546$	95	37
	0,123	$\pm 0,0060$	10	
	0,125	$\pm 0,0018$	3	
0,15	0,127	$\pm 0,0267$	42	36
	0,135	$\pm 0,0246$	36	
0,20 bis 0,25	0,234	$\pm 0,0170$	15	14
	0,238	$\pm 0,0138$	12	
0,25 bis 0,30	0,251	$\pm 0,0100$	8	9
	0,256	$\pm 0,0124$	10	

Tab. 14: Einfluß von CCl_4 -Resten auf die Länge der Konfidenzintervalle ($\gamma = 0,95$) der arithmetischen Mittel der Extinktions-Meßwerte (ΔE_{550}) bei der turbidimetrischen Erfassung von Keimkonzentrationen (WAK I) innerhalb definierter Gruppen von Meßwerten.

Nach der getrennten Überprüfung der Auswirkung von CCl_4 auf die optische Dichte bzw. die Keimzahl wurde der lineare Zusammenhang der beiden Zufallsvariablen X und Y mittels Korrelationsanalyse untersucht. Der Korrelationskoeffizient (r) vor CCl_4 beträgt 0,973. Das ist sicherlich kein überraschendes Ergebnis. Schon lange wird das bewährte Verfahren der Keimzahlbestimmung mit Hilfe turbidimetrischer Messung aufgrund dieser linearen Abhängigkeit verwendet.

Für das hier entwickelte Testsystem ist allerdings von Bedeutung, ob sich auch nach CCl_4 -Behandlung eine vergleichbare lineare Abhängigkeit zwischen den Variablen ergibt. Der Wert des Korrelationskoeffizienten für die Meßdaten nach CCl_4 -Behandlung ($r = 0,970$) zeigt, daß eine lineare Abhängigkeit zwischen optischer Dichte und Keimzahl besteht. Diesbezüglich ist die optische Dichte also auch nach CCl_4 -Behandlung ein geeignetes Mittel für die Bestimmung der Keimzahlen. Diese Linearität sowie die Abhängigkeit der Zufallsvariablen Y von X ist u.a. Voraussetzung für lineare Regressionsanalysen. Dabei werden den beobachteten Daten Regressionsgeraden ($y = \alpha + \beta x + \epsilon$ mit $E(\epsilon) = 0$ und $V(\epsilon) = \sigma^2$) angepaßt. Aufgrund der üblichen logarithmischen Darstellung der Mikroorganismenkonzentrationen (N/ml) sind die Geraden in den Abbildungen 30a,b und 31a,b entsprechend transformiert als Kurven dargestellt. Im Text werden sie aber weiterhin als Geraden bezeichnet. Die Zufallsvariable Y ist entsprechend dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt. Homoskedastizität wird vorausgesetzt. Die Standardfehler der Schätzungen $s_{y..x}$, d.h. das Maß für die Abweichungen der beobachteten Meßwerte y_i (N/ml) vom Modellwert $\hat{y}_i$ bei vorgegebenem x_i -Wert (ΔE) sind numerisch als gleich anzusehen: vor CCl_4 , $s_{y..x} = 3,824 \times 10^6$; nach CCl_4 , $s_{y..x} = 3,82 \times 10^6$. Da Y keine stetige Zufallsvariable ist, kann ein Vergleich der Standardabweichungen mit statistischen Standardverfahren nicht durchgeführt werden.

Abb. 32a

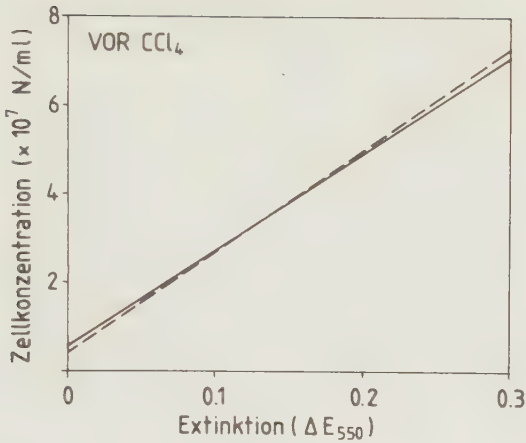


Abb. 32b

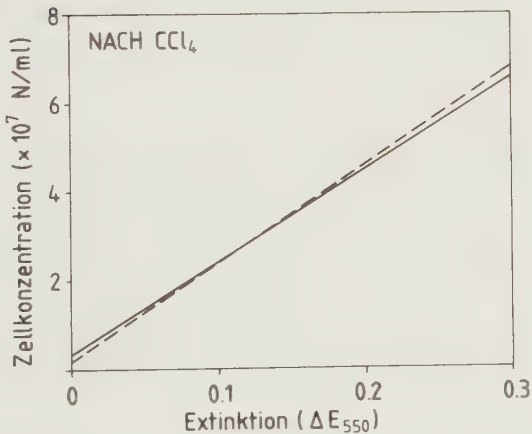


Abb. 32: Zusammenhang zwischen Extinktion (ΔE_{550}) und Zellkonzentration (N/ml) - Regressionsanalytische Modelle $y = \alpha_y + \beta_y x + \epsilon_y$ und $x = \alpha_x + \beta_x y + \epsilon_x$ mit $E(\epsilon_{y|x=w,x}) = 0$ und $V(\epsilon_{y|x=w,x}) = \sigma^2$ vor (Abb. 32a) bzw. nach der Behandlung mit CCl_4 (Abb. 32b). Aus Gründen der Anschaulichkeit erfolgte die graphische Darstellung der diskreten abhängigen Zufallsvariablen als Linienzug: durchgezogen für $\hat{y}$ als Predictor, gestrichelt für $\hat{x}$ als Predictor.

Sind beide Variablen, wie in unserem Fall, Zufallsvariablen, so existieren zwei Regressionsgeraden, eine mit $\hat{y}$ als Predictor sowie eine mit $\hat{x}$ als Predictor. Es ergeben sich folgende Geradengleichungen:

Vor CCl₄: $\hat{y} = 5,53 \times 10^6 + 2,17 \times 10^9 x$; $\hat{x} = - 0,018 + 4,37 \times 10^{-9} y$.

Nach CCl₄: $\hat{y} = 3,15 \times 10^6 + 2,075 \times 10^9 x$; $\hat{x} = - 0,007 + 4,53 \times 10^{-9} y$.

Wie aus Abb. 32a,b ersichtlich, sind die beiden Geraden nahezu identisch. Darauf deuteten auch die Schätzwerte für die Korrelation hin. Aufgrund der Tatsache, daß die beiden Regressionsgeraden vor bzw. nach CCl₄ nur unwesentlich voneinander abweichen und für das Testsystem nur die Situation, für gemessene ΔE -Werte die Keimzahl ($\hat{y}$) ermitteln zu wollen, von Bedeutung ist, werden die Regressionsgeraden für $\hat{x}$ vernachlässigt. Die transformierten Regressionsgeraden $\hat{y}$ sind auch in Abb. 30a,b bzw. Abb. 31a,b dargestellt und kennzeichnen den Meßdatenverlauf.

Vergleicht man nun die Regressionsgeraden $\hat{y}$ für die Meßwertpaare vor und nach CCl₄-Behandlung miteinander, stellt sich die Frage, ob sich die Steigungen der Regressionsgeraden vor und nach CCl₄ signifikant voneinander unterscheiden, ob sich also CCl₄ derart auswirkt, daß dieser Einfluß durch einen Berechnungsmodus berücksichtigt werden müßte. Die Prüfung auf Signifikanz der Differenzen wird durch Vergleich der beiden Regressionskoeffizienten b_v (vor CCl₄) und b_n (nach CCl₄) nach Sachs (1984) geprüft. Unter der Annahme, daß es sich um unabhängige Stichproben aus Grundgesamtheiten mit gleichen Restvarianzen handelt, wird die zweiseitige Fragestellung mit $H_0: \beta_v = \beta_n$ geprüft. Wäre H_0 bei zweiseitiger Fragestellung zu verwerfen, ließen sich als Alternativhypothesen $\beta_v > \beta_n$ bzw. $\beta_n > \beta_v$ testen. Wir erhalten als Schätzwert für die Statistikgröße $t = 0,527$. Anhand der t-Verteilung zeigt

sich, daß $t = 0,527 < t_{36,0,05,zweiseitig} = 2,028$ ist. Auf dem Signifikanzniveau von 5 % läßt sich die Nullhypothese $\beta_v = \beta_n$ also nicht ablehnen. Selbst bei Zulassung eines Fehlers erster Art von 50 % für den zweiseitigen Test ($t = 0,527 < t_{36,0,5} = 0,681$) kann die Nullhypothese nicht verworfen werden. Der Unterschied der beiden Regressionskoeffizienten und damit der beiden Geraden ist also statistisch nicht signifikant. Daraus läßt sich folgern, daß sowohl nach statistischer Überprüfung als auch aus der Sicht der(s) Biologin(en) der Einsatz von CCl_4 zur Abtrennung von Öl aus wässrigen mikroorganismenhaltigen Medien sowohl für die turbidimetrische Messung von Keimzahlen als auch für die Bestimmung mit Hilfe der Zählkammer geeignet ist. Bei der Anwendung von CCl_4 zur Bestimmung der Keimzahlen im Wachstumsverlauf (Versuchsansatz s. 3.4.6.) stellte sich jedoch heraus, daß dies Verfahren nur bedingt einsetzbar ist. Während der Inkubation von Mikroorganismen in Ölmedien wird das Öl durch die von den Mikroorganismen exkretierten Emulgatoren zunehmend in Mikrotröpfchen zerteilt, was die Abtrennung des Öls durch CCl_4 erschwert (s. Abb. 33). Die Messung der optischen Dichte wird demzufolge in steigendem Maße durch Restöl gestört. Bei den Wachstumsversuchen (3.4.6.) ergab sich, daß ab 48 Stunden nach Beginn der logarithmischen Wachstumsphase die gemessene optische Dichte nicht mehr mit der gezählten Mikroorganismenzahl korrelierte. Eine Bestimmung der Mikroorganismenkonzentration unter Verwendung der Zählkammer ist dagegen auch weiterhin möglich.

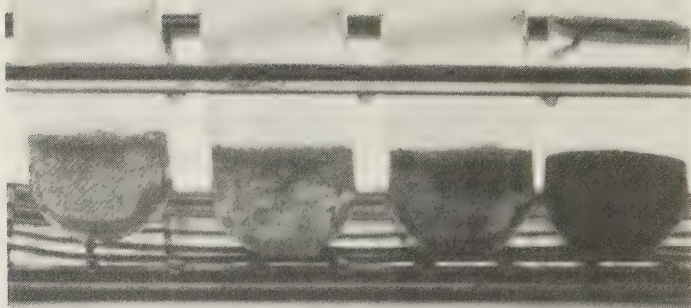


Abb. 33: Einfluß der mikrobiellen Emulgierung von Öl auf die Separation des Öls aus wässrigen Medien durch 10 % (v/v) CCl_4 . Links: drei Proben vom Wachstumsversuch (U3) mit Mikroorganismen aus Wattsediment ohne experimentelle Ölkontamination (Crildumer Siel). Inkubation: 30 °C, 70 rpm, 96 h - d.h. 48 h nach Beginn der logarithmischen Wachstumsphase in SSV-Medium plus 1 % Statfjordöl. Rechts: SSV-Medium plus 1 % Öl ohne Mikroorganismen.

3.4.6. Wachstumsversuche zur Entwicklung einer Methode zur Erfassung ölabbauender Mikroorganismen mit Einsatz von Tetrachlorkohlenstoff zur Abtrennung des Öls

Die vorangegangenen Tests (s. Abschnitte 3.4.4. und 3.4.5.) befaßten sich zum einen mit der Eignung des Einsatzes von CCl_4 zur Abtrennung von Öl für die turbidimetrische und mikroskopische Bestimmung von Keimzahlen pro Volumeneinheit, zum anderen mit dem Einfluß von CCl_4 auf die Meßgenauigkeit der turbidimetrischen bzw. mikroskopischen Untersuchungen. Hierbei war es zunächst nicht notwendig, eine Differenzierung hinsichtlich der Zusammensetzung der eingesetzten Mikroorganismen zu machen. Das

Ziel eines Ölabbauer-Testsystems ist nun aber die Ermittlung des Anteils ölabbauender Mikroorganismen an der Gesamtmikroorganismenpopulation. Bei dem in dieser Arbeit entwickelten Testverfahren wurde hierfür zunächst das Wachstumsverhalten von Wattmikroorganismen mit Öl als alleiniger C-Quelle untersucht.

Für diese Wachstumskurven wurden Wattsedimente eingesetzt, bei denen eine unterschiedliche Zusammensetzung der Mikroorganismenpopulation hinsichtlich ölabbauender und nicht-ölabbauender Mikroorganismen zu erwarten war: Wattsediment vom Crildumer Siel, das keiner experimentellen Kontamination mit Öl ausgesetzt war (Wachstumsversuche U1, U2, U3 und U4) und Sediment vom Gebiet Vareler Watt (Wachstumsversuche K1, K2 und K3). Letzteres stammte von experimentell verölten Testfeldern (Höpner et al., 1985a) und wies sichtbare Ölsuren auf. Zur Erhöhung der Mikroorganismenkonzentration der Wattproben fand eine Vorinkubation (WAK II, s. 2.4.2.) statt. Der mikroorganismenhaltige Überstand (Gewinnung s. WAK I) wurde für die Hauptkulturen auf einen Starttiter von jeweils ca. 1×10^7 verdünnt. Dieser Starttiter wurde gewählt, um vom Beginn der Inkubation an eine Ermittlung der Mikroorganismenkonzentration mit Hilfe der Zählkammer zu gewährleisten. Das Inokulum für die Hauptkulturen entstammte der logarithmischen Wachstumsphase der Vorinkubationskultur; die Inokulummenge betrug jeweils 5 %. Die Inkubation für die Wachstumskurven fand in Seewassermedium (SV bzw. ohne Spurenelemente, Gesamtvolumen jeweils 250 ml) unter Zusatz von 1 % Statfjordöl bei 30 °C, 70 rpm über 7 Tage statt. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen, das Öl mit CCl_4 "entfernt" und im resultierenden Überstand die Keimzahl (N/ml) mit der Bakterienzählkammer bestimmt. Die optische Dichte wurde hier nicht weiter behandelt, da sie zur Bestimmung der Keimzahlen in Wachstumskurven ungeeignet ist (s. Abschnitt 3.4.5.). Die Abb. 34a zeigt den Keimzahlverlauf (N/ml, gezählt) der Wachstumsversuche U; in Abb. 34b sind die Keimzahlen (N/ml, gezählt) der Wachstumsversuche K gegen die Zeit dargestellt.

Abb. 34a

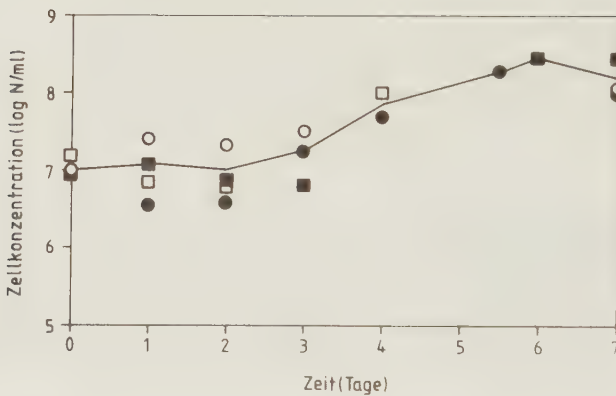


Abb. 34b

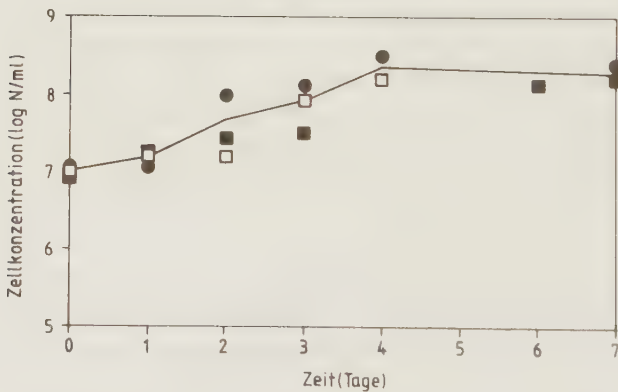


Abb. 34: Mikroorganismenkonzentration (log N/ml) von Wattmischkulturen aus Sediment (Crildumer Siel) ohne experimentelle ölkontamination (Abb. 34a, U1 ■, U2 □, U3 ●, U4 ○) bzw. aus Sediment (Vareler Watt) mit experimenteller ölkontamination (Abb. 34b, K1 ■, K2 ●, K3 □). Inkubation: 7 d, 30 °C, M₂K-Medium. Die arithmetischen Mittelwerte von vier bzw. drei Wachstumskurven ergeben den Verlauf (durchgezogene Linie).

Die Wachstumsversuche U1 und K1 wurden im Gegensatz zu allen anderen hier dargestellten Kulturen ohne Spurenelementzusatz durchgeführt. Trotzdem konnten diese Versuche zur Auswertung herangezogen werden. Die zum Ansetzen des künstlichen Seewassers verwendeten Salze hatten die Qualität p.a., enthielten also Spurenelemente in Form von Verunreinigungen. Tait (1971) weist darauf hin, daß diese Mengen Spurenelemente oft schon in höheren Konzentrationen vorhanden sind als im natürlichen Seewasser vorkommend. In der vorliegenden Arbeit konnte dies bestätigt werden: Der Versuch mit unkontaminiertem Sediment, der sowohl mit als auch ohne Spurenelementzusatz durchgeführt wurde, ergab kein unterschiedliches Wachstumsverhalten der Mikroorganismen (s. Abb. 35).

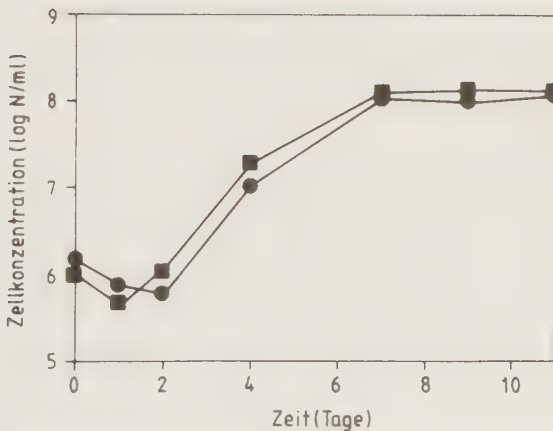


Abb. 35: Mikroorganismenkonzentration (log N/ml) von Wattmischkulturen aus Sediment (Crildumer Siel) ohne ölkontamination in künstlichem Seewasser mit 1 % (v/v) Statfjordöl mit Spurenelementzusatz (■) bzw. ohne Zusatz von Spurenelementen (●). Inkubation: 11 d, 30 °C.

Abb. 36a

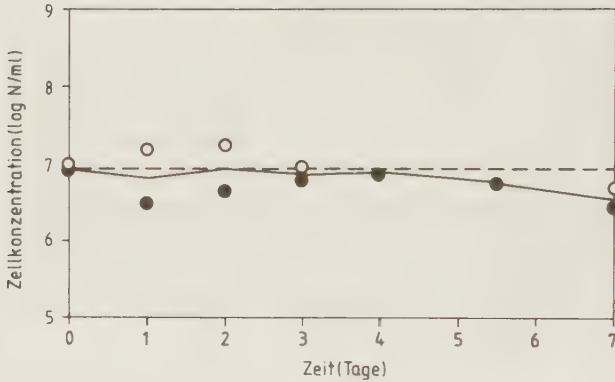


Abb. 36b

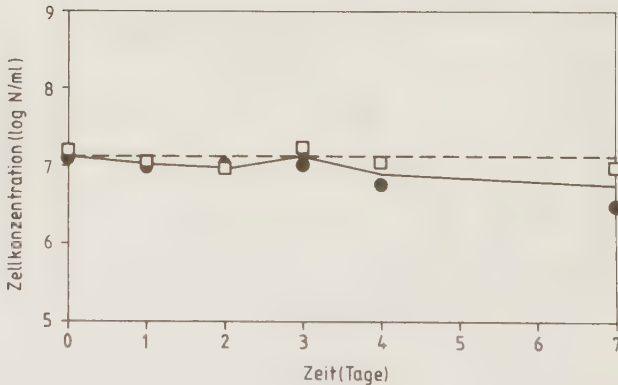


Abb. 36: Mikroorganismenkonzentration (log N/ml) von Watt-mischkulturen aus Sediment ohne Ölkontamination (Abb. 36a, Parallelkontrollen zu U3 ●, U4 ○) bzw. aus Sediment mit experimenteller Ölkontamination (Abb. 36b, Parallelkontrollen zu K2 □, K3 ●) in Seewasser-SV-Medium ohne Öl als Kohlenstoffquelle. Inkubation: 7 d, 30 °C.

Bei der Bestimmung der Konzentration ölabbauender Mikroorganismen in Ölmedien tritt die Frage auf, inwieweit der am Inkubationsstart vorhandene Anteil nicht-ölabbauender Mikroorganismen in der Lage ist, sich durch Restteilung zu vermehren bzw., wenn dies der Fall ist, wann die Reserven zur Gewährleistung dieser Vermehrung erschöpft sind. Um zu prüfen, ob der Verlauf der Wachstumskurven der ölabbauenden Mikroorganismen, d.h. die Konzentration dieser Mikroorganismen durch Restteilungen der nicht-ölabbauenden Mikroorganismen beeinflusst wird, fanden zu Wachstumsversuchen U3 und U4 sowie K2 und K3 Parallelkontrollen mit Seewasser-SV-Medium ohne C-Quelle statt. Die Ergebnisse sind in Abb. 36a bzw. 36b dargestellt. Eine Restteilung der nicht-ölabbauenden Mikroorganismen im C-freien Medium ist nicht zu verzeichnen. Die arithmetischen Mittel der Keimzahlen (N/ml) aus den Parallelkontrollen U bzw. K bleiben unterhalb des Animpftiters. Eine "Verfälschung" der Konzentration ölabbauender Mikroorganismen und somit der Wachstumskurven durch Restteilung von nicht-ölabbauenden Mikroorganismen ist also nicht vorhanden.

Die angeimpfte Mikroorganismenpopulation (N_0) der Wachstumsversuche setzt sich zusammen aus nicht-ölabbauenden Mikroorganismen (N_1), deren Konzentration aufgrund der nicht verwertbaren C-Quelle konstant bleibt, und ölabbauenden Organismen (N_2), die sich vermehren und während der logarithmischen Wachstumsphase durch die Teilungsrate v charakterisiert sind. Es gelten somit folgende Beziehungen:

$$N_0 = N_1 + N_2$$

bzw. für die Mikroorganismenkonzentration (N) zur Zeit t:

$$N_t = N_1 + N_2 \times 2^{vt}$$

Die Berechnung der maximalen Teilungsraten (v) der Wachstumskurven U bzw. K fand mit Hilfe des Regressionskoeffizienten (b) der Regressionsgeraden ($\hat{y} = a + bx$) der log-Phasen der gemittelten Wachstumskurven U (Inkubationstag 2 bis 6) bzw. K (Inkubationstag 0 bis 4) nach folgenden Beziehungen statt:

$$b = \frac{Q_{xy}}{Q_x} \text{ bzw. } b = \frac{\Delta(\log N)}{\Delta t}$$

$$\text{mit } Q_{xy} = \sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n} \text{ bzw. } Q_x = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}, \text{ wobei}$$

y die Keimkonzentration ($\log N/\text{ml}$), x die Inkubationszeit (h) und n den Stichprobenumfang bedeuten.

Die Teilungsrate mit der Beziehung

$$v = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2 (t - t_0)}$$

läßt sich also unter Kenntnis des Regressionskoeffizienten b wie folgt ermitteln:

$$v = \frac{b}{\log 2}.$$

Die so berechnete maximale Teilungsrate (v) der Mikroorganismen des unkontaminierten Sediments (Versuche U; Regressionsgerade der Daten der log-Phase: $\hat{y} = 6,28 + 0,0153x$) beträgt $v_u = 0,051 \text{ h}^{-1}$. Die Mikroorganismen der Versuche K (kontaminiertes Sediment; Regressionsgerade der Daten der log-Phase: $\hat{y} = 6,96 + 0,0142x$) haben eine maximale Teilungsrate von $v_k = 0,047 \text{ h}^{-1}$.

Beim Vergleich der gemittelten Kurvenverläufe der Kulturen der Wachstumskurven U -unkontaminiertes Sediment (s. Abb. 34a)- und K -kontaminiertes Sediment (s. Abb. 34b)- fällt die Adaptationszeit der Versuchsläufe U von $T_1 = 48$ h auf. Der gemittelte Wachstumsverlauf der Versuche K weist dagegen keine Adaptationsphase auf. Bei beiden Wachstumskurven betrug die maximal erreichte Keimzahl ca. $2,5 \times 10^8$ N/ml. Nicht nur Faktoren wie z.B. Umbildung des Enzymsystems oder die Bildung und Exkretion von sogenannten Startermetaboliten, sondern auch der Anteil nicht vermehrungsfähiger (bzw. sich extrem langsam teilender) Mikroorganismen im Inokulum beeinflussen die Länge der lag-Phase. Man unterscheidet daher zwischen der wahren lag-Phase, also der Adaptation, und der scheinbaren lag-Phase, resultierend aus Adaptation und/oder dem Anteil vermehrungsunfähiger Mikroorganismen (Dean & Hinshelwood, 1966; Oberzill, 1967; Bailey & Ollis, 1977). Die Auswirkung des Anteils vermehrungsunfähiger Mikroorganismen, in unserem Fall der nicht-ölabbauenden Organismen, läßt sich anhand des folgenden Modells veranschaulichen. Unter Annahme prozentual unterschiedlicher Anteile von nichtölabbauenden (N_1) und ölabbauenden (N_2) Mikroorganismen im Animpfvolumen ($N_0 = N_1 + N_2$), einer maximalen Teilungsrate von $\nu = 0,05$ (h^{-1}) der ölabbauenden Mikroorganismen sowie einem Starttiter für N_0 von 10^7 N/ml kann das Wachstumsverhalten dieser Populationsgemische entsprechend der obigen Beziehung für die Keimzahl N zur Zeit t beschrieben werden (s. Abb. 37). Deutlich zeigt sich dabei die Abhängigkeit der lag-Phase vom Anteil der vermehrungsunfähigen Mikroorganismen. Eine Entscheidung, inwieweit die lag-Phase der Versuchsläufe U von Adaptation bzw. des Anteils vermehrungsunfähiger Mikroorganismen beeinflußt wird, ist somit zur Berechnung des Anteils nicht zum Ölabbau fähiger Mikroorganismen im Inokulum notwendig.

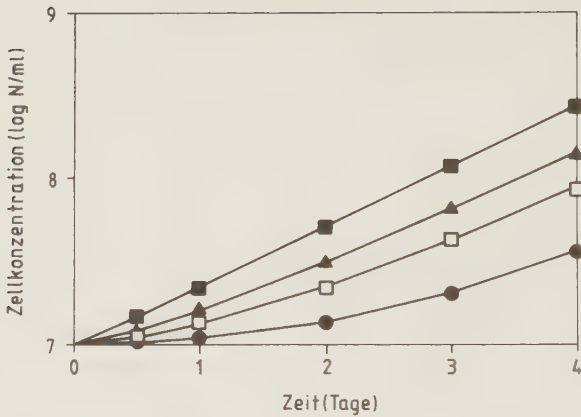


Abb. 37: Ausbildung einer "scheinbaren" Adaptationsphase aufgrund des Anteils nicht vermehrungsfähiger Mikroorganismen im Medium anhand des berechneten Verlaufs der Zellkonzentration ($\log N/\text{ml}$) zur Zeit t nach der Beziehung $N_t = N_1 + N_2 \cdot 2^{0,05t}$ mit N_1 = Konzentration nicht-ölabbauender Mikroorganismen und N_2 = Konzentration ölabbauender Mikroorganismen in einem Medium mit Öl als alleiniger Kohlenstoffquelle. Folgende Konzentrationsbeispiele bei einem angenommenen Starttiter von $10^7 N/\text{ml}$ ($N_1 + N_2$) sind abgebildet: $N_2 = 10\%$ (●), $N_2 = 30\%$ (□), $N_2 = 50\%$ (▲) und $N_2 = 100\%$ (■).

Die wahre Länge der lag-Phase sowie die wahre Generationszeit lassen sich bestimmen, indem man als Inokulum für die Ermittlung der Wachstumskurve eine verhältnismäßig geringe Keimzahl wählt (z.B. 10^5 N/ml). Dabei geht man davon aus, daß $N_0 \gg N_1$ und der Einfluß der nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen also sowohl auf die lag-Phase als auch auf die Generationszeit verschwindend gering ist. Bei Verwendung eines "großen" Inokulums (ca. das 100 fache, also z.B. 10^7 N/ml) wird dagegen der Anteil N_1 an N_0 groß, was die Berechnung der scheinbaren lag-Phase sowie der scheinbaren Generationszeit ermöglicht (Dean & Hinshelwood, 1966; Bailey & Ollis, 1977). Entsprechend wurden Wachstumskurven mit Wattmischpopulationen mit dem Starttiter 10^5 N/ml bzw. parallel dazu mit 10^7 N/ml durchgeführt. Verwendet wurde das unkontaminierte Wattsediment vom Crildumer Siel. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 dargestellt.

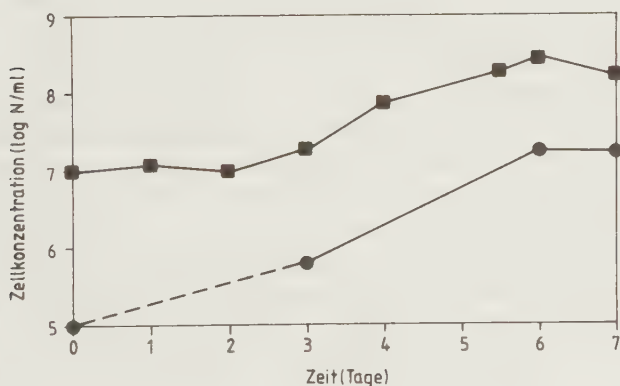


Abb. 38: Mikroorganismenkonzentration (log N/ml) von Wattmischkulturen aus Sediment (Crildumer Siel) ohne experimentelle ölkontamination mit einer Zellkonzentration am Inkubationsstart von 10^5 N/ml (●) bzw. 10^7 N/ml (■, Kurvenverlauf entspricht den arithmetischen Mittelwerten von 4 Versuchsläufen). Inkubation: 7 d, 30 °C, M_2K -Medium.

Die Wachstumskurve mit unkontaminiertem Wattsediment und dem Starttiter 10^5 N/ml ergibt eine Adaptationsphase von $T_1 = 36$ h, die als wahre Adaptationszeit, d.h. ohne den Einfluß des Anteils vermehrungsunfähiger Mikroorganismen, zu bewerten ist. Für die gemittelte Wachstumskurve der Versuche U (gemittelter Starttiter $1,08 \times 10^7$ N/ml) wurde eine Adaptationsphase von $T_1 = 48$ h errechnet. Daraus ergibt sich nun, daß sich die berechnete Adaptationsphase von 48 h zusammensetzt aus 36 h Adaptation (u.a. die Umstellung des Enzymsystems auf die Verwertung von Öl) und 12 h, verursacht durch den Anteil vermehrungsunfähiger Mikroorganismen, in diesem Fall also durch den Anteil der Mikroorganismen, die nicht in der Lage sind, Öl als C-Quelle zu nutzen. Unter Kenntnis der wahren Adaptationsphase läßt sich nun der Anteil der ölabbauenden (im Öl-medium vermehrungsfähigen) Mikroorganismen (N_2) an der am Inkubationsstart vorhandenen Population ($N_1 + N_2$) berechnen: Der Schnittpunkt der um die wahre lag-Phase verschobenen Ordinate mit der verlängerten Regressionsgeraden der logarithmischen Phase ergibt die Zahl ölabbauender Mikroorganismen am Beginn der Inkubation. Für die Wachstumsversuche U (unkontaminiertes Sediment) ergibt sich somit anhand der den Daten der log-Phase angepaßten Regressionsgeraden $\hat{y} = 6,28 + 0,0153x$ und dem Wert für $x = 36$ h für die Zahl der ölabbauer am Inkubationsstart ($\hat{y}$) 6,83 log N/ml, bzw. $6,76 \times 10^6$ N/ml. Bezieht man diese ölabbauerkemmzahl auf den gemittelten Starttiter ($1,08 \times 10^7$ N/ml = 100 %) der Versuche mit unkontaminiertem Wattsediment und transformiert in relative Werte, so ergibt sich ein Anteil ölabbauender Mikroorganismen an der Gesamtmikroorganismenpopulation von 63 %.

Bei der Berechnung der Zahl ölabbauender Mikroorganismen für die Wachstumsversuche K (kontaminiertes Sediment) ist keine Adaptationsphase zu berücksichtigen (s. Abb. 34b). Anhand der den Daten der logarithmischen Wachstumsphase angepaßten Regressionsgeraden $\hat{y} = 6,96 + 0,0142x$ läßt sich

die Startkeimzahl der ölabbauenden Mikroorganismen für $x = 0$ h, d.h. zu Inkubationsbeginn, als Schnittpunkt mit der Ordinaten ablesen. Die Keimzahl ölabbauender Mikroorganismen im geprüften kontaminierten Wattsediment beträgt $6,96 \log N/ml$ bzw. $9,12 \times 10^6 N/ml$ oder als relativer Wert bezogen auf den gemittelten Starttiter ($1,1 \times 10^7 N/ml$) 83 % der insgesamt eingesetzten Mikroorganismenpopulation. Diese für unkontaminiertes bzw. kontaminiertes Wattsediment ermittelten Daten geben den Anteil ölabbauender Mikroorganismen unserer Modellansätze an.

Die Präzision der Keimzahlen ölabbauender Mikroorganismen, berechnet anhand der den jeweiligen gemittelten logarithmischen Wachstumsphasen angepaßten Regressionsgeraden $\hat{y} = a + bx$ hängt u.a. von den Differenzen zwischen den Meßwerten (hier die arithmetischen Mittel aus 3 bzw. 4 Versuchsläufen) und den aus der Regressionsgleichung geschätzten Daten ab. Sie kann durch die Konfidenzintervalle für die Parameter α und β beschrieben werden. Dabei geht man von der Normalverteilung der Schätzer a und b aus. Für die Versuche U mit der Regressionsgeraden $\hat{y} = 6,28 + 0,0153x$ ergibt sich, daß sich die Modellparameter α bzw. β mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % innerhalb der Konfidenzintervalle $Konf\{5,89; 6,67\}$ bzw. $Konf\{0,014; 0,0192\}$ befinden. Entsprechend dem Wert β wird der wahre Wert ($\gamma = 95$ %) der maximalen Teilungsrates μ_v vom Konfidenzintervall $Konf\{0,038; 0,064\}$ überdeckt. Für die Wachstumsversuche K (Regressionsgerade: $\hat{y} = 6,96 + 0,0142x$) liegen die Modellparameter α bzw. β mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % innerhalb der Konfidenzintervalle $Konf\{6,78; 7,14\}$ bzw. $Konf\{0,0104; 0,018\}$. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % wird der wahre Wert μ_v der Versuche K, entsprechend dem Parameter β , vom Konfidenzintervall $Konf\{0,035; 0,06\}$ überdeckt.

Transformiert man die obigen Grenzen der Konfidenzintervalle in relative Werte, bezogen auf das entsprechende arithmetische Mittel, ergibt sich, daß der jeweilige Erwartungswert ($\gamma = 95\%$) innerhalb folgender Grenzen zu finden ist: Wachstumsversuche U (unkontaminiertes Sediment) - für den Parameter α zwischen 94 % und 106 % und für den Parameter β zwischen 75 % und 125 %. Wachstumsversuche K (kontaminiertes Sediment) - für den Parameter α zwischen 97 % und 103 % und für den Steigungsparameter β zwischen 73 % und 127 %. Insgesamt betrachtet handelt es sich bei den Wachstumsversuchen U bzw. K hinsichtlich der Parameter α und β der jeweiligen Regressionsgleichung um Konfidenzintervalle geringer Länge. Die quantitative Erfassung ölabbauender Mikroorganismen auf Basis der Regressionsgeraden der logarithmischen Wachstumsphase ist daher entsprechend präzise.

Tab. 15: Keimzahlen ölabbauender Mikroorganismen (N/ml) berechnet anhand der Regressionsgeraden der logarithmischen Wachstumsphasen der Versuche K (ölkontaminiertes Sediment) einzeln (K1, K2 und K3) bzw. aus dem gemittelten Kurvenverlauf (K).

Ver- such	Regressionsgerade den Daten der log- w.t.phase angepaßt	Keimzahl ölabb. Mikroorg. [N/ml] gerundet	arithm. Mittel der K.z. öl- abbauender Mikroorg. [N/ml]
K1	$\hat{y} = 7,03 + 0,0073x$	$1,1 \times 10^7$	$9,6 \times 10^6$
K2	$\hat{y} = 7,0 + 0,0158x$	$1,0 \times 10^7$	
K3	$\hat{y} = 6,91 + 0,013x$	$8,1 \times 10^6$	
K	$\hat{y} = 6,96 + 0,0142x$	$9,1 \times 10^6$	

Für die Ermittlung der Keimzahl ölabbauender Mikroorganismen wurden die entsprechenden, als Parallelen konzipierten, Wachstumsversuche zusammengefaßt. Die Variabilität dieser parallelen Ansätze sowie der anhand der logarithmischen Phase von Wachstumskurven ermittelten Keimzahlen ölabbauender Mikroorganismen ist vom Kurvenverlauf abhängig. Die drei Wachstumsversuche mit kontaminiertem Sediment (K1, K2 und K3) wurden daher zusätzlich einzeln betrachtet. Die den jeweiligen Meßdaten der logarithmischen Wachstumsphase angepaßten Regressionsgeraden sowie die entsprechend der obigen Darstellung berechneten Keimzahlen ölabbauender Mikroorganismen wurden für die einzelnen Wachstumskurven ermittelt (s. Tab. 15). Für die drei Wachstumsversuche K beträgt das arithmetische Mittel der Ölabbauerkeimzahl $9,7 \times 10^6$ N/ml mit den Extremwerten $1,1 \times 10^7$ N/ml und $8,1 \times 10^6$ N/ml. Transformiert in relative Werte und bezogen auf das arithmetische Mittel findet man für die Wachstumsversuche K Abweichungen von 84 % bis 113 %. Unter Verwendung der Standardabweichung und des arithmetischen Mittels dieser anhand der einzelnen Wachstumskurven berechneten Ölabbauerkeimzahlen wurde das Konfidenzintervall ($\gamma = 95 \%$) für den Erwartungswert geschätzt. Beim arithmetischen Mittel von $9,7 \times 10^6$ N/ml wird der wahre Wert vom Konfidenzintervall $\text{Konf}\{6,1 \times 10^6 \text{ N/ml}; 1,3 \times 10^7 \text{ N/ml}\}$ überdeckt. Transformiert man diese Konfidenzintervallgrenzen ebenfalls in relative Werte, läßt sich konstatieren, daß der Erwartungswert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % zwischen 63 % und 134 % liegt. Hierbei ist zu beachten, daß für die Berechnung des Konfidenzintervalls lediglich drei Parallelen zur Verfügung stehen und der resultierende Einfluß auf die Länge des Intervalls relativ groß ist. Entsprechende Kalkulationen der Ölabbauerkeimzahlen der Wachstumsversuche U (unkontaminiertes Sediment) konnten nicht durchgeführt werden, da für die Berechnung der Regressionsgeraden der jeweiligen logarithmischen Wachstumsphase nicht ausreichend Meßdaten zur Verfügung stehen (s. Abb. 34a).

Die hier genannten Konfidenzintervalle und prozentualen Abweichungen beziehen sich auf die Daten der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Wachstumskurven. Sie sind daher nicht als allgemein gültige Abweichungen der Keimzahlen ölabbauender Mikroorganismen des hier entwickelten Bestimmungsverfahrens anzusehen.

Für die quantitative Erfassung ölabbauender Mikroorganismen in Wattsedimenten läßt sich entsprechend der in Abschnitt 3.3. und 3.4. dargestellten Ergebnisse folgender Testansatz formulieren:

Testansatz zur quantitativen Erfassung ölabbauender Mikroorganismen in Wattsediment anhand von Wachstumskulturen

Pro Wachstumskultur werden 100 ml Medium M₂K mit jeweils 10 % (v/v) Inokulumvolumen eingesetzt. Die Mikroorganismenkonzentrationen am Inkubationsstart sind 10^7 N/ml bzw. 10^5 N/ml. Das Probevolumen zur Keimzahlbestimmung beträgt 4 ml bzw. 8 ml (bei Keimkonzentrationen $< 10^7$ N/ml). Eine Mikroorganismenkonzentration von 10^7 N/g Feuchtsediment ist die bei diesem Bestimmungsverfahren einzusetzende Mindestmenge. Bei einer solchen Mikroorganismenkonzentration ergibt sich folgende Vorgehensweise:

1. Abtrennen der Mikroorganismen vom Sediment

200 g Wattsediment (10^7 N/g Feuchtsediment) werden im Verhältnis 1:3 (w/v) mit künstlichem Seewasser, enthaltend 0,5 % (v/v) TWEEN 80, versetzt und ca. 30-60 sec. mit dem Whirimix homogenisiert. Das Sediment wird abzentrifugiert (ca. 250 g, 5 Min, 5 °C) und der mikroorganismenhaltige Überstand für die Wachstumskulturen weiterverwendet.

2. Ansetzen der Wachstumskulturen

2.1. Wachstumskultur mit Starttiter 10^7 N/ml

Die Mikroorganismen aus 300 ml Überstand werden abzentrifugiert (ca. 8000 g, 10 Min., 5 °C), das Pellet in 10 ml künstlichem Seewasser resuspendiert und auf 100 ml Medium angeimpft. Inkubation bei 30 °C bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase, dabei tägliche Probenahme.

2.2. Wachstumskultur mit Starttiter 10^5 N/ml

10 ml mikroorganismenhaltiger Überstand werden 1:3 (v/v) mit künstlichem Seewasser verdünnt. 10 ml dieser Suspension werden als Inokulum für 100 ml Medium verwendet. Inkubation und Probenahme wie oben.

3. Bestimmung der Keimkonzentrationen und Erstellen der Wachstumskurven

4 ml Probe mit 10 % (v/v) CCl_4 versetzen und die Keimkonzentration pro ml mit Hilfe der Zählkammer bestimmen. Auftragen der Keimkonzentration gegen die Inkubationsdauer. Bei Mikroorganismenkonzentrationen $< 10^7$ N/ml in der Kulturbrühe muß nach der Behandlung mit CCl_4 ein 10:1-Konzentrationsschritt durchgeführt werden. Um ausreichend Organismensuspension für drei Zählungen mit jeweils neu gefüllter Kammer zur Verfügung zu haben, sollte das Probenvolumen verdoppelt werden.

Nach Erstellen der Wachstumskurven können die Adaptationsphase (wahre lag-Phase) ermittelt und die Keimzahl ölabbauender Mikroorganismen am Inkubationsstart berechnet werden.

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Freiland- und Laboruntersuchungen zum mikrobiellen Kohlenwasserstoffabbau in Wattsedimenten

Ausgangspunkt dieser Arbeit war das Szenario einer großflächigen, aber dünnsschichtigen Verölung der Schlickwattflächen nach einem Tankerunfall in der Deutschen Bucht. Der natürliche biologische Ölabbau ist in diesem Fall die letzte mögliche "Öl-Beseitigungsmaßnahme" (s. Abb. 39). Die Fragestellung war - im Hinblick auf Empfehlungen zu Ölbekämpfungsmaßnahmen - ob und auf welche Weise der durch Mikroorganismen stattfindende Ölabbau zu fördern sei. In Zusammenarbeit mit anderen Fachdisziplinen (Biochemie, Botanik und Zoologie, s. Höpner et al., 1985a und Kant et al., 1985) wurde in dieser Arbeit der mikrobiologische Aspekt dieser Fragestellung untersucht.

Um die mikrobielle Aktivität in den untersuchten Sedimenten bzw. die Auswirkungen der getesteten Versuchsparameter (u.a. eventuell toxische Wirkungen) auf die ölabbauenden Mikroorganismen abschätzen zu können, wurden Lebendkeimzahlbestimmungen (TCFU) durchgeführt.

Die Lebendkeimzahlbestimmungen erfassen - durch die Wahl der Inkubationsbedingungen festgelegt - bei uns die aerobe, vermehrungsfähige Bakterien- und Hefepopulation. Bakterien und Hefen gelten als die vorherrschenden ölabbauenden Mikroorganismen im marinen Milieu (Atlas, 1981). Innerhalb der öloxidierenden Mikroorganismen stellen Bakterien mit Vertretern aus 22 Gattungen die größte Fraktion dar (Bartha & Atlas, 1977). In weitaus geringerem Maße wurde eine Öloxidation durch Cyanobakterien und Algen (Walker et al., 1975) sowie Pilzen (Floodgate, 1984) festgestellt.

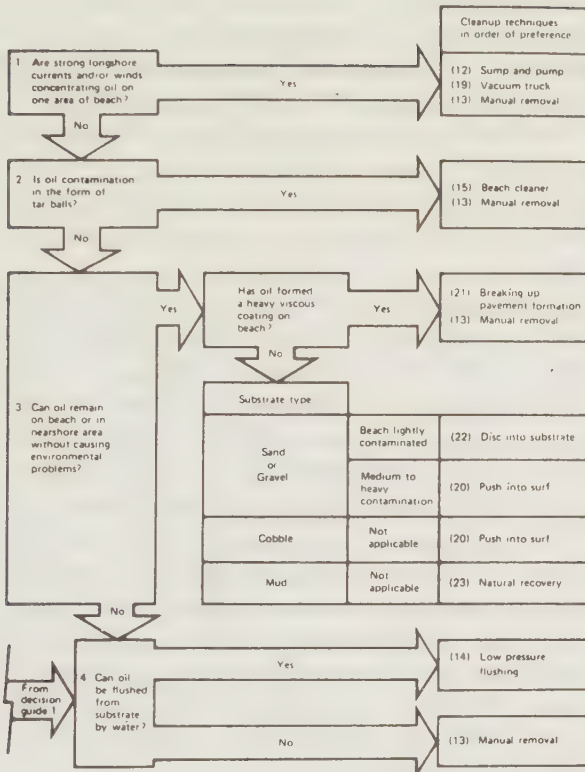


Abb. 39: Ölunfall-Bekämpfungsmethoden, Entscheidungsbaum (aus Breuel, 1981).

Bei der Konzipierung der Experimente war ursprünglich neben der Lebendkeimzahlbestimmung eine Bestimmung der öloxydierenden Mikroorganismen geplant gewesen. Diese Messung sollte eine wichtige Information zur Einschätzung des Ölabbau potentials der untersuchten Wattflächen erbringen. Entsprechende Bestimmungen wurden zunächst auch durchgeführt. In Konsequenz aus aufgearbeiteten Proben

ergab sich, daß herkömmliche Methoden (s. Abschnitt 3.4.1. und 3.4.2.) für unser Bestreben, Ölabbauerkeimzahldaten möglichst rasch für Ölbekämpfungsstrategien zur Verfügung zu stellen ungeeignet bzw. nur bedingt geeignet waren. Es wurde daher ein dafür geeignetes qualitatives Bestimmungsverfahren entwickelt (s. Abschnitt 3.4.3.), das in Abschnitt 4.2. diskutiert wird. Die durchgeführten Lebendkeimzahlbestimmungen (TCFU) erfassen gemeinsam öl-oxidierende und nicht-öloxidierende Mikroorganismen. Zu den letzteren zählen auch die öltoleranten Mikroorganismen, die u.a. die von den ölabbauenden Mikroorganismen produzierten Metabolite nutzen können (Bartha & Atlas, 1977). Laut Literatur schwankt der Anteil ölabbauender Mikroorganismen an der Gesamtpopulation je nach Biotop zwischen 0,1 % in zivilisationsfernen und 100 % in Kohlenwasserstoff-belasteten Gebieten (ZoBell, 1969; Atlas, 1981). Untersuchungen von Walker et al. (1975) zeigten, daß selbst in einem als unbelastet geltenden, für die Fischwirtschaft genutzten Gebiet (Eastern Bay, Teil der Cheasapeake Bay am Atlantischen Ozean) der Anteil öloxidierender Mikroorganismen an der Gesamtmikroorganismenpopulation in Sedimentproben mindestens 16 % betrug. Die ökologische Situation wird also durch die taxonomische Zusammensetzung einer Population widerspiegelt.

Für die Problemstellungen ist in diesem Zusammenhang die besondere Situation im Jadebusenbereich relevant. Für die Nordsee und insbesondere für das Untersuchungsgebiet Jadebusen gilt bereits seit Jahren eine permanente ölverschmutzung. Die Belastung des Jadebusens ist einerseits durch die Nähe des ölhafens Wilhelmshaven, andererseits durch den geringen Wasseraustausch der Bucht mit dem offenen Meer - wodurch eine Akkumulation der Schadstoffe entsteht - besonders hoch (Gassmann & Gunkel, 1983; Martin & Walter, 1984). Eine ähnliche Situation konnte auch für die Sedimentproben von Crildumer Siel (s. Abb. 2), ebenfalls in der Nähe von Wilhelmshaven gelegen, angenommen

werden. Daher war in dieser Arbeit mit einem hohen Anteil ölabbauender Mikroorganismen an der Gesamtpopulation zu rechnen (Mulkin-Phillips & Stewart, 1974; Jordan & Payne, 1980; Gassmann & Gunkel, 1983; Pfaender & Buckley, 1984). Es kann deshalb für diese Untersuchungen als gesichert gelten, daß die Bestimmungen der Lebendkeimzahlen als Aussagewert (Indikator) für den mikrobiellen Ölabbau dienen können.

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Nährstoffversorgung der Wattoberfläche (hier Vareler Watt) ist bei einer Ölkontamination unter der herrschenden Sauerstofflimitierung für die Mikroorganismen als ausreichend anzusehen.
2. Unter Aufhebung dieser Sauerstofflimitierung bedarf das gleiche, ölkontaminierte Sediment hinsichtlich der Mikroorganismen einer zusätzlichen Nährstoffversorgung.
3. Die den Ernstfall simulierende, dünnsschichtige Ölkontamination der Schlickwattflächen zeigte keine negativen Auswirkungen auf die Lebendkeimzahlen der Sedimentoberfläche. Unter diesen Bedingungen ist also keine Zerstörung der ölabbauenden Mikroorganismenpopulation zu erwarten.
4. Auch in tieferen Sedimentschichten (bis 5 cm Tiefe) liegt ein unter Sauerstoffzufuhr mobilisierbarer, hoher Anteil an öloxydierenden Mikroorganismen vor.
5. Mechanische Störung der Wattflächen hat ein Absinken der Lebendkeimzahlen zur Folge.
6. Von den drei exemplarisch geprüften Dispergatoren zeigte sich nur bei dem Einsatz von THL keine Wachstums-
hemmung der Mikroorganismen. Eine Steigerung der Ölabbauraten konnte mit den Dispergatoren nicht erreicht werden.

7. Die mikrobielle Kohlenwasserstoffabbauleistung im aerob gehaltenen Schlickwatt ist extrem hoch und übersteigt alle bisher laut Literatur gemessenen Werte bei weitem.
8. Eine künstliche Ausbringung öloxidierender Mikroorganismen bei einem Ölunfall zur Förderung des Ölabbaus ist überflüssig.

In den Freilanduntersuchungen im Vareler Watt wurde zunächst die These der Stickstoff- bzw. Phosphatlimitierung des mikrobiellen Ölabbaus geprüft, d.h., ob eine Düngung dünnflächig mit Öl kontaminierter Wattflächen sinnvoll sein könnte. Die Untersuchungen auf den Versuchsflächen (1.1.-1.5.) ergaben, daß die Stickstoff- und Phosphatdüngung vernachlässigbare Einflüsse auf die Lebendkeimzahlen zeigte. Bei den Einzelzugaben der Nährstoffe konnte lediglich für das mit Stickstoff gedüngte Feld (1.3.) eine leichte Erhöhung der Keimzahlen festgestellt werden. Dieser Effekt wiederholte sich jedoch weder auf dem mit Stickstoff und Phosphat gedüngten Testfeld (1.5.) noch auf dem mit Magnesiumammoniumphosphat gedüngten Testfeld (2.3.) Von daher ist zu vermuten, daß die leichte Keimzahlerhöhung (Feld 1.3.) auf einen anderen Grund als die N-Düngung zurückzuführen ist. Dies wird auch durch die Untersuchungen der Nährstoffmessungen im Porenwasser des Sediments bestätigt. Laut Wonneberger (1985) ist die mittlere Ammoniumkonzentration am höchsten im mit N + P gedüngten Feld (1.5.). Feld 1.3., das durch seine hohen Keimzahlwerte auffiel, zeigte im Vergleich zu den übrigen Feldern dagegen nur leicht erhöhte Ammoniumwerte.

Die Resultate der entsprechenden Versuchsflächen 1.1.-1.5. sowie 2.1.-2.5. ergaben, da keine Keimzahlsteigerungen beobachtet werden konnten, daß die Nährstoffversorgung der Schlickwattoberfläche unter "normalen" Umständen, d.h. ohne extreme Kohlenwasserstoffbelastung als für die Mikroorganismen ausreichend angesehen werden kann.

Ob diese Nährstoffversorgung der Wattoberfläche aber auch bei einer Ölkontamination ausreichend ist, wurde in einer weiteren Versuchsreihe geprüft. Nach den Daten von Gibbs et al., (1975) kalkuliert, wird beim Abbau einer Tonne Öl zusätzlich ca. 60 kg Stickstoff und 6 kg Phosphor benötigt. Dieser Bedarf steigt laut Gibbs et al. (1975) noch bei sinkenden Temperaturen aufgrund der damit verbundenen niedrigeren Remineralisierungsraten.

Diese Daten gelten für Meerwasser; aufgrund der o.g. Problemstellung erschienen diese Angaben auch für die Wattensedimente prüfenswert.

Bei den Versuchsflächen 2.1.-2.5. sollte aber nicht nur die Frage der Nährstoffversorgung bei einer Ölkontamination sondern auch die Wirkung des Öls allein auf das Mikroorganismenwachstum untersucht werden.

Die Resultate der Testflächen 2.1.-2.5. zeigten, daß die Ölzugabe - über den Meßzeitraum gesehen - weder eine Keimzahlsteigerung noch einen Abfall bewirkte (s. Abb. 10). Der Keimzahlverlauf war ähnlich, wie von Krumbein et al. (1984) beschrieben. Der einzige Unterschied im Vergleich zu den nicht mit Öl kontaminierten Feldern lag darin, daß der bei allen Feldern nach der Bearbeitung erfolgende Keimzahlabfall bei den ölkontaminierten Feldern (2.4. und 2.5., s. Abb. 10) wesentlich langsamer verlief. Die Ölzugabe hatte also offensichtlich auf die Population keinen akut toxischen Effekt. Es fand aber vermutlich eine Verschiebung des Artenspektrums zugunsten der ölabbauenden bzw. öltoleranten Mikroorganismen statt, womit die Reduktion der Lebendkeimzahlkonzentration der ölsensiblen Mikroorganismen kompensiert wurde. Diese wahrscheinliche Veränderung der Population (Gunkel, 1968a; Bartha & Atlas, 1977) konnte aber mit der Lebendkeimzahlbestimmung, deren Problematik bereits diskutiert wurde, nur angenommen werden.

Mit der von uns durchgeführten künstlichen Verölung wurde ein wahrscheinlicher Fall für die Wattensedimente simuliert. Die Resultate der Versuchsserie zeigten für diesen Fall, daß eine Zerstörung der Mikroorganismenpopulation nicht zu erwarten ist. Die Ölkonzentration war in dem hier gewählten Fall offensichtlich nicht hoch genug gewesen, um die Population nachhaltig zu schädigen, was z.B. an starken Keimzahleinbrüchen sichtbar gewesen wäre. Starke Keimzahlanstiege, wie von Gunkel (1968a) u.a. für Wattensedimente beschrieben, blieben aber ebenfalls aus. Hier ergab sich die Frage, ob andere Faktoren außer dem Öl die Keimzahlhöhe limitierten (s.u.). Man muß sich bei dieser positiven Aussage aber bewußt sein, daß es sich bei dem beprobten Gebiet im Jadebusen um ein latent mit Öl kontaminiertes Areal handelte und die ortsansässigen Populationen, wie bereits diskutiert, öladaptiert sind. Aus dem hier erhaltenen Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchungen darf natürlich nicht geschlossen werden, daß die Ölkontamination für das Biotop irrelevant sei, die höher organisierten Organismen zeigten deutlich negative Reaktionen.

So reagierte z.B. das Mikrophytobenthos auf Verölungen sowohl mit einem Bestandsrückgang als auch mit einer Artenverschiebung (Ramm, 1985). Die Verölungen des bei einem Tankerunfall ebenfalls betroffenen Deichvorlandes führten zur Verminderung von Artenzahlen sowie Gesamtdeckung der dort ansässigen Pflanzen (Golombek & Neugebohrn, 1985).

In den Freilanduntersuchungen konnte ein erhöhter Nährstoffbedarf der Mikroorganismen durch den Ölabbau nicht festgestellt werden. Das Verhalten der Lebendkeimzahlen war sowohl auf den ungedüngten als auch auf den gedüngten Öltestfeldern über den gemessenen Zeitraum hin annähernd gleich (s. Abb. 10). Dieses Resultat der Nährstoffversorgung konnte auch durch die Untersuchungsergebnisse von anderen Autoren (s. Höpner et al., 1985a) bestätigt

werden. Die natürliche Nährstoffversorgung (N,P) nahm im Bereich des abzubauenen Öls nicht ab. Die Remineralisationsgeschwindigkeit war unter den gewählten Bedingungen also ausreichend, selbst beim erhöhten Nährstoffverbrauch durch Ölkontamination. Die Sauerstoffversorgung im Sediment - besonders, wenn nach der Ölverschmutzung Überschlickungen folgen - war der limitierende Faktor (Höpner et al., 1985a).

Ungenügende Sauerstoff-Versorgung - als abiotischer Faktor - behindert den Kohlenwasserstoffabbau stark, da der erste Reaktionsschritt jeden Kohlenwasserstoffabbaus obligat sauerstoffabhängig ist. Bei diesem Reaktionsschritt werden aliphatische bzw. aromatische Kohlenwasserstoffe unter Katalyse von Oxygenasen zu Alkoholen oder Phenolen hydroxyliert, wobei ausschließlich molekularer Sauerstoff als Sauerstoffdonor dienen kann. Die weiteren Folgereaktionen des Kohlenwasserstoffabbaus zu letztendlich CO_2 und H_2O können entweder aerob erfolgen - dabei dient molekularer Sauerstoff als Elektronenakzeptor - oder anaerob - dabei können Nitrat oder Sulfat als Elektronenakzeptoren dienen (Höpner und Mitarbeiter, 1987). Ein Ölabbau unter strikt anaeroben Bedingungen ist demnach nicht möglich. Gemessenen Ölabbauraten in anaeroben Sedimenten sind vermutlich auf ein langsames Diffundieren von Sauerstoff in diese Schichten zurückzuführen. Die Möglichkeit eines anaeroben Ölabbaus konnte bislang aber noch nicht eindeutig ausgeschlossen werden, da Berichte über anaerobe alkanabbauende Mikroorganismen existieren (Chouteau et al., 1962; Traxler & Bernard, 1969). Belegt ist durch Experimente mit ^{14}C -markierten Kohlenwasserstoffen, daß die Abbaugeschwindigkeit unter anaeroben Bedingungen ökologisch vernachlässigbar ist im Vergleich zum aeroben Abbau (Ward et al., 1980). Ward et al. (1980) zeigten, daß unter aeroben Bedingungen in 14 Tagen > 20 % des zugefügten Kohlenwasserstoffs zu CO_2 abgebaut wurde; unter anaeroben Bedingungen wurde in 233 Tagen < 5 % derselben

Kohlenwasserstoffmenge abgebaut. Für die komplette aerobe Oxidation von 1 mg Kohlenwasserstoff zu $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ sind 3-4 mg O_2 notwendig (Gunkel, 1972; Jordan & Payne, 1980). Dieser abiotische Faktor ist also insbesondere für die Wattenmeersedimente, die dazu tendieren, unter der Oberfläche schnell anaerob zu werden (Floodgate, 1984), zu beachten. Hielt man die Wattsedimente aerob, stiegen Lebendkeimzahlen, Ölabbau und Nährstoffbedarf, wie in den Laboruntersuchungen dieser Arbeit (s. Kap. 3.2.) gezeigt wird.

Im Hinblick auf Ölbekämpfungsmaßnahmen kann also von der mikrobiologischen Seite aus festgestellt werden, daß die Düngung von dünnflächig mit Öl kontaminierten Wattflächen bei der natürlich vorliegenden Sauerstofflimitierung überflüssig ist.

Betrachtet man den Verlauf der Keimzahlen über das Jahr, so lassen sich die bereits von Gunkel (1968b) beschriebenen, jahreszeitlich bedingten Keimzahlschwankungen besonders im Frühjahr feststellen (unbearbeitete Kontrollfelder 1.1. und 2.1., s. Abb. 10). Dies zeigt, daß bei der Auswertung des Keimzahlverhaltens andere Einflüsse als die getesteten Parameter - gerade bei einer ökologischen Untersuchung - nicht unberücksichtigt bleiben dürfen. Undefinierbare Störungen wie u.a. Stürme, Sedimentumlagerungen, Bioturbation gehen in die Meßwerte ein. Betrachtet man die erhaltenen Ergebnisse entsprechend kritisch, ist für die realistische Einschätzung einer ökologischen Situation diese Feldarbeit aber unerlässlich. Am günstigsten ist eine Kombination aus Freilanduntersuchungen und Laborexperimenten mit vergleichbaren Versuchszielen. Vorteil der Laborversuche ist, daß die Versuchsbedingungen definiert und konstant gehalten werden können. Somit können die im Freiland erzielten Ergebnisse unbeeinflusst von undefinierbaren Störungen überprüft werden bzw. deren Aussagen - durch die Wahl von Testbedingungen, die im Freiland nicht zu simulieren wären - erweitert werden.

Im folgenden Abschnitt wird erneut der mikrobielle Kohlenwasserstoffabbau in Wattsedimenten, diesmal unter definierten Laborbedingungen, diskutiert. Im Gegensatz zu den Feldexperimenten wurde in den Laborexperimenten im "geschlossenen" System gearbeitet, womit eine Unterscheidung zwischen mikrobiellem Kohlenwasserstoffabbau und Mechanismen wie Evaporation oder Elimination in den Wasserkörper ermöglicht wurde (Kant et al., 1985). Zusätzlich wurden die Wattsedimente aerob gehalten. Wie bereits bei den Resultaten der Feldexperimente diskutiert, war die Sauerstoffversorgung im Sediment unter natürlichen Bedingungen der limitierende Faktor für den mikrobiellen Kohlenwasserstoffabbau. In diesen Untersuchungen wurde nach Aufhebung der Sauerstofflimitierung durch die Kulturansätze nach dem nächsten, den mikrobiologischen Ölabbau begrenzenden Faktor gesucht. Er wurde in der Frage der Nährstoffversorgung (Stickstoff und Phosphat) vermutet (s. Höpner et al., 1987). Es wurde daher geprüft, ob sich die Zugabe von Nährstoffen auf die Lebendkeimzahlen (TCFU) im aerob gehaltenen Schlick- bzw. Sandwatt steigernd auswirkte.

Die Versuchsergebnisse ergaben, daß die Nährstoffversorgung des aeroben Schlickwatts ohne Kohlenwasserstoff-Kontamination hinsichtlich des Mikroorganismenwachstums als ausreichend angesehen werden konnte (s. Abb. 14a).

Gegensätzlich hierzu wurde beim aeroben Sandwatt mit der Nährstoffzugabe eine Steigerung der Lebendkeimzahlkonzentration (TCFU) erreicht (s. Abb. 14b). Bereits bei diesen Untersuchungen zeigte sich, daß sich die erzielten Resultate nur durch allgemeine Ausgangsunterschiede der untersuchten Sedimente erklären ließen. Im Sandwatt war im Gegensatz zum Schlickwatt offensichtlich endogenes, organisches Material vorhanden, das bei dem zuvor vorliegenden Nährstoffmangel (N,P) nicht abgebaut werden konnte. Somit wirkte die Nährstoffzugabe steigernd auf die Lebendkeimzahlen. Die festgestellten Lebendkeimzahlsteigerungen im Sandwatt stehen im Gegensatz zu Untersuchungen von

Gunkel (1967), bei denen ein derartiger Nährstoffeinfluß im sandigen Litoralsediment nicht gefunden wurde.

In der Diskussion um Ölbekämpfungsmaßnahmen steht eine Strategie, die durch eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Sediments (s. S. 154) den Ölabbau fördern soll. Eine solche Maßnahme ist besonders bei nicht behebarem Schlickwatt, das sich anderen Ölbekämpfungsmaßnahmen entzieht (Breuel, 1981), angebracht. Es wurde geprüft, ob parallel zu der Belüftung des kohlenwasserstoffkontaminierten Sediments eine Düngung mit Nährstoffen (N,P) zur Steigerung der Abbauraten bzw. Lebendkeimzahlen (TCFU) notwendig ist. Vergleichsweise wurden dazu Sand- und Schlickwatt untersucht, beim Schlickwatt zusätzlich zwei unterschiedlich dem Tidewechsel ausgesetzte Sedimente (s. Abschnitt 2.8.1).

Die Schlickwattsedimentprobe aus dem aperiodisch überfluteten Wattareal zeigte hinsichtlich der Lebendkeimzahlkonzentration keine Reaktion auf Kohlenwasserstoff- oder Stickstoff- und Phosphatzugaben (s. Abb. 15a,b und 16a,b). Gegensätzlich dazu bewirken bei der Schlickwattsedimentprobe aus dem periodisch überfluteten Wattgebiet sowohl Nährstoff (N,P)- als auch Kohlenwasserstoffzugaben einen Lebendkeimzahlanstieg (s. Abb. 17a+b; 18a+b, untere Kurven).

Die These, daß das Lebendkeimzahlverhalten in Abhängigkeit vom untersuchten Sediment steht, wurde auch hier wieder bestätigt. Die differierenden Sedimentzustände wurden durch weitere Fakten, wie niedrige Startkeimzahlen beim aperiodisch überfluteten Watt sowie einen Unterschied im Verhältnis gefärbter zu ungefärbten Kolonien auf den Agarplatten bei der Lebendkeimzahlbestimmung unterstützt.

Zusammenfassend konnte also für das aerobe Schlickwatt eine Nährstoffabhängigkeit (N,P), gemessen an der Lebendkeimzahldichte, verneint werden. Erst bei Zugabe von

Kohlenwasserstoffen ergaben sich sedimentabhängige Unterschiede. Das periodisch überflutete Watt bedarf bei Aufhebung der Sauerstofflimitierung der Nährstoffzufuhr, das aperiodisch überflutete Watt nicht.

Die beim periodisch überfluteten Watt bei der TCFU-Bestimmung ermittelten notwendigen Nährstoffzugaben wurden auch durch die Messungen der Abbauraten bestätigt. Die mikrobiellen Kohlenwasserstoffabbauraten konnten durch Nährstoffzugaben gesteigert werden (s. Abb. 20a-d).

Nach den erzielten Resultaten kann für die geschilderte Ölbekämpfungsstrategie, die eine Belüftung des kontaminierten Sediments vornimmt, die Empfehlung einer zusätzlichen Nährstoffversorgung - allerdings nur für das periodisch überflutete Schlickwatt - ausgesprochen werden. Hier wird bereits beim Schlickwatt die Problematik deutlich, daß kein Modell universell anwendbar ist.

Das vergleichsweise zum Schlickwatt untersuchte Sandwatt zeigte eine deutliche Steigerung der Lebendkeimzahlen bei Stickstoff- und Phosphatzugaben. Alleinige Kohlenwasserstoffzugaben bewirkten nur eine minimale Keimzahlsteigerung. Erst bei der kombinierten Zugabe von Stickstoff, Phosphat und Kohlenwasserstoffen konnte eine Lebendkeimzahlerhöhung festgestellt werden. Diese Resultate machen deutlich, daß im aeroben Sandwatt aufgrund des vorliegenden Stickstoff- und Phosphatmangels angebotene C-Quellen, wie die Kohlenwasserstoffe, nicht genutzt werden konnten.

Die parallel dazu gemessenen Abbauraten zeigten ein unerwartetes Resultat. Im Sandwatt erfolgte kein Abbau von Kohlenwasserstoffen innerhalb des Inkubationszeitraumes, weder mit noch ohne Stickstoff- und Phosphatzusatz (s. Abb. 21). Es erhob sich die Frage, worauf die Lebendkeimzahlsteigerungen zurückzuführen wären, wenn kein Kohlenwasserstoffabbau stattfindet. Es besteht die Mög-

lichkeit, daß der Inkubationszeitraum von 40 Tagen für eine Messung des Kohlenwasserstoffabbaus nicht ausreichend ist. Vergleichbare Messungen, allerdings ohne Aufhebung der Sauerstofflimitierung, führte Johnston (1970) durch. Er verfolgte den Kohlenwasserstoffabbau bei 10 °C über mindestens 3 Monate, teilweise bis zu 6 Monaten. Es ist also möglich, daß ein Kohlenwasserstoffabbau bei den von uns untersuchten Proben bereits eingesetzt hatte, aber nur das geringe Ausmaß noch nicht den Messungen zugänglich war.

Dieser Vorgang ist aber nicht sehr wahrscheinlich, da in allen, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen stets eine Erhöhung der Lebendkeimzahlkonzentration mit erhöhten Ölabbauraten korreliert war. Worauf der ausbleibende Ölabbau bei gleichzeitiger Keimzahlstimulierung beruht, ist offen.

Die in den Laboruntersuchungen gewählte Relation zwischen Sediment und eingesetzter Kohlenwasserstoffmenge erschöpfte nicht die Absorptionskapazität der Sedimentpartikel für Kohlenwasserstoffe (Kant et al., 1985). Bei der Erhöhung des Kohlenwasserstoffeinsatzes von 100 µl auf 500 µl pro Standardansatz (s. Abschnitt 2.5.2.) stiegen die Abbauraten um das fünffache, sie waren abhängig von der eingesetzten Kohlenwasserstoffmenge. Eine weitere Steigerung der Abbauraten bei höherem Kohlenwasserstoffeinsatz wurde vermutet (Kant et al., 1985). Die in diesen Untersuchungen zunächst geprüfte Kohlenwasserstoffmenge von 100 µl pro Standardansatz hatte weder mit noch ohne Stickstoff und Phosphatzusatz einen Einfluß auf die Lebendkeimzahldichte. Erst bei der Zugabe von 500 µl Kohlenwasserstoff pro Standardansatz konnte ein Anstieg der Lebendkeimzahlen beobachtet werden. Für diese Anstiege sind offensichtlich bestimmte Mindestmengen des Kohlenwasserstoff-Substrats notwendig, besonders, wenn es sich, wie bei den untersuchten Sedimenten, um Proben mit öladaptierten Populationen handelt.

In einem weiteren Versuchsabschnitt wurde die Effektivität dreier exemplarisch ausgewählter Dispergatoren, Corexit 9527, Metryl OD und THL sowohl im Freiland- als auch im Laborversuch im Hinblick auf eine Steigerung des Mikroorganismenwachstums sowie der mikrobiologischen Kohlenwasserstoffabbauraten und der Ölelimination aus dem Sediment getestet.

Nach den Resultaten der Freiland-Versuchsflächen (Felder 3.1. - 3.5.) konnte festgestellt werden, daß die drei geprüften Dispergatoren keinen steigernden Einfluß auf die Lebendkeimzahlen hatten (s. Abb. 11a und 11b). Der bereits beschriebene mögliche positive Effekt von dispergiertem Öl wurde in unserem Fall vermutlich durch die hemmende Wirkung der Dispergatoren überlagert.

Als besonders negativ im Hinblick auf die Keimzahlen fiel Corexit 9527 auf. In dem mit Corexit 9527 behandelten Feld wurden die durchschnittlich niedrigsten Keimzahlen gemessen. Wie weitere Resultate zeigten, wirkte - entgegen unserer Planung - Corexit 9527 sogar der Ölelimination aus dem Sediment entgegen (s. Höpner et al., 1985a).

Für das mit THL behandelte Feld fallen für Juli - Dezember (s. Abb. 11a und 11b) durchschnittlich niedrigere Lebendkeimzahlen als beim unbehandelten Feld (3.1.a) auf und für das mit Metryl OD behandelte Feld gilt eine deutlich länger Lebendkeimzahl-Absinkphase nach der Kontamination. Nach unseren Resultaten wurde die Ölelimination aus dem Sediment durch THL gefördert, wohingegen Metryl OD keine erkennbare bzw. verwertbare Wirkung hatte.

Als Folgerung ergibt sich, daß der Einsatz von Metryl OD zwar keine toxischen Auswirkungen auf die Mikroorganismen zeigt, das Öl aber im Wattensediment verbleibt und die Verwendung von Metryl OD daher überflüssig bzw. im Hinblick auf das gesamte Ökosystem sogar nachteilig ist. Der Einsatzzweck von THL ist die Erschwerung der Benetzung des Sediments mit Öl. Daher kann sich zusätzlich mit der fest-

gestellten, schnelleren Elimination des Öls aus dem Sediment die vorbeugende Imprägnierung gefährdeter Wattflächen mit THL empfehlen. Aber von der mikrobiologischen Seite her hatte die Anwendung dieses Dispergators in den Freilanduntersuchungen auf Lebendkeimzahlen keinen positiven Effekt.

In den Laboruntersuchungen zum Effektivitätstest von Dispergatoren wurden zunächst die Wirkungen der Kohlenwasserstoffgemische ohne Dispergatorzusatz geprüft. Wie Abb. 24d zeigt, ist zu Versuchsbeginn, besonders beim Ölzusatz, ein Absinken der Lebendkeimzahlen zu verzeichnen. Eine Keimzahlabnahme einer mikrobiellen Population ist, wenn sie Kohlenwasserstoffen ausgesetzt wird, nichts Ungewöhnliches. Die toxische Wirkung von Rohöl auf Mikroorganismen beruht auf bakterioziden bzw. bakteriostatischen Wirkungen einiger Ölfractionen, z.B. einigen aromatischen Verbindungen (Bartha & Atlas, 1977). Nach Walker und Colwell (1975) ist die toxische Wirkung von Öl aber u.a. abhängig von der vorliegenden Populationszusammensetzung. Taxonomisch an Öl adaptierte Populationen können bei einer Kohlenwasserstoffkontamination sogar mit einer Biomassenzunahme reagieren. Die in unseren Experimenten eingesetzte Population war stark öladaptiert; es war also mit einem ähnlichen Verhalten wie bei Walker und Colwell (1975) beschrieben, zu rechnen, zumindest nicht mit einer Populationsabnahme. Zudem wurde in den Experimenten stets mit abgetopptem Öl gearbeitet, d.h. ein großer Anteil an niedrigsiedenden Kohlenwasserstoffen mit hoher Toxizität wurde vor Versuchsbeginn ausgeschaltet. Dennoch wurde in den ersten Tagen nach Versuchsbeginn die o.g. Lebendkeimzahlabnahme (s. Abb. 24d) verzeichnet. Parallele Vergleichsmöglichkeiten zu den zuvor erfolgten Versuchen liegen nicht vor, da dort eine vergleichbare Messung erst nach 10 Tagen Inkubationszeit erfolgte. Die toxische Wirkung der Kohlenwasserstoffe auf die Population wurde innerhalb weniger Tage aufgehoben, die Lebendkeimzahlen

erreichten nach ca. 10 Tagen Inkubationszeit wieder die Ausgangskeimzahlkonzentration und stiegen weiter an. Die Abbildungen 24a-c zeigen, daß die Kombinationen Kohlenwasserstoff-Dispergator unterschiedliche Effekte auf die Lebendkeimzahlen haben. Die Gemische Kohlenwasserstoff-Corexit 9527 bzw. Kohlenwasserstoff-Metryl OD bewirken einen starken Lebendkeimzahlabfall zu Versuchsbeginn, er übersteigt den Lebendkeimzahlabfall bei der alleinigen Kohlenwasserstoffzugabe um ca. eine Zehner-Potenz. Diese negativen Effekte der Dispergatoren auf die Lebendkeimzahlen wurden ebenfalls bei den Felduntersuchungen festgestellt.

Corexit 9527 gehört zu den toxikologisch gut untersuchten Dispergatoren. Generell ist bei Dispergatoren eine große Effektivität mit einer hohen Toxizität gekoppelt (Wells, 1984). Foght und Westlake (1982) berichteten, daß Corexit 9527 zwar eine geringere Toxizität als viele, in den 1960'ern verwendeten Dispergatoren aufweist, jedoch beschrieben sie negative Einflüsse auf eukaryotische Zellen, auf bakterielle Aktivitäten und mikrobielle Ölabbau-Prozesse im marinen Bereich. Untersuchungen von Griffiths et al. (1981) zeigten, daß bei einer Corexit 9527-Konzentration von 1 mg/l und einer 4-stündigen Exposition die Glucose-Aufnahme benthischer Mikroorganismen um ca. 10 % sank. Entsprechende Untersuchungen für den Dispergator Metryl OD liegen nicht vor.

Es ist wahrscheinlich, daß der durch die Dispergatoren Corexit 9527 sowie Metryl OD in Kombination mit Kohlenwasserstoffen verstärkte Lebendkeimzahlabfall zu Versuchsbeginn auf toxische Effekte der Dispergatoren zurückzuführen ist. Obwohl es sich bei den beiden verwendeten Dispergatoren um Produkte mit unterschiedlicher Toxizität handelt (s. Kap. 1.), verhielten sie sich hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Lebendkeimzahldichte ähnlich. Die "Nivellierung" der unterschiedlichen Dispergatortoxizitäten kann nur durch unterschiedliche Wechselwirkungen der Dispergatoren mit dem Öl und dem Sediment erklärt werden.

Bereits in den Freilanduntersuchungen wurde die Bindung des Öls durch Corexit 9527 im Sediment beschrieben.

Das Kohlenwasserstoff-THL-Gemisch hingegen wirkte auf die Lebendkeimzahlen völlig anders. Der Lebendkeimzahlabfall zu Versuchsbeginn blieb aus, THL setzte somit sogar die Toxizität des Öls gegenüber den Mikroorganismen herab. In den Felduntersuchungen war THL dadurch aufgefallen, daß es die Ölelimination aus dem Sediment förderte. Auf die Mikroorganismen zeigte es dort keinen keimzahlstimulierenden Effekt.

Bei THL handelt es sich um ein natürliches Produkt aus mikrobiellem Wachstum auf n-Alkanen (Lang & Wagner, 1985). Es erniedrigt die Grenzflächenspannung zwischen Kohlenwasserstoff und Wasser um einen für die Mikroorganismen günstigeren Faktor als bei synthetischen Dispergatoren (Wagner, 1984). Damit könnte der das Wachstum der Mikroorganismen begünstigende Effekt des THL im Vergleich zu den anderen Dispergatoren erklärt werden. Worauf der in den Laboruntersuchungen festgestellte Kohlenwasserstofftoxizitätserniedrigende Effekt des THL beruht, ist offen.

Bei Betrachtung der Detergentienauswirkungen auf die Kohlenwasserstoffabbauraten lassen sich, wie die Abb. 25a (Hexadecan) zeigt, keine signifikanten Einflüsse der Dispergatoren feststellen. In Abb. 25b wird der negative Effekt des Corexit 9527, dem Ölabbau entgegenzuwirken, deutlich. Hier kommt wieder der bereits erörterte negative Effekt des Corexit 9527 zum Tragen, das Öl im Sediment zu binden. Vermutlich wird das Öl durch den Dispergator in einer den Mikroorganismen schwer zugänglichen Form an die Sedimentpartikel angelagert.

Warum dieser Effekt nicht auch beim mit Corexit 9527 behandelten Hexadecan auftritt, ist fraglich. Hexadecan und Öl sind jedoch sehr unterschiedlich strukturierte Moleküle und die möglichen Wechselwirkungen im Sediment sind zu komplex, als daß diese Frage aus den vorliegenden Daten beantwortet werden könnte.

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, daß von einem Einsatz der Dispergatoren von der Art wie Corexit 9527 bzw. Metryl OD auf Schlicksedimenten dringend abzuraten ist. Diese Empfehlung wurde bereits nach den Resultaten der Freilandarbeiten, wo mit sauerstofflimitierten Sedimenten gearbeitet wurde, ausgesprochen. Auch für die aerob gehaltenen Schlickwattsedimente mußte diese Empfehlung wiederholt werden. Der Kohlenwasserstoffabbau konnte durch den Dispergatoreinsatz nicht beschleunigt werden. Zudem bestehen toxikologische Bedenken. Zwar erholte sich die untersuchte Mikroorganismenpopulation rasch wieder, es wurde jedoch auch nur mit relativ geringen Dispergatorkonzentrationen gearbeitet. Sie betrugen 10 % der Kohlenwasserstoffmenge, d.h. 0,1 mg pro 100 g Sediment. Diese Konzentrationen könnten im Freiland, wo nicht so ideale Mischungsverhältnisse vorliegen, leicht überschritten werden und sich entsprechend negativ auf die Organismen auswirken. Auch darf bei einer Anwendungsempfehlung nicht unberücksichtigt bleiben, daß Corexit 9527, stellvertretend für viele ähnliche Dispergatoren, entscheidende negative Einflüsse auch auf höher organisierte Lebewesen ausübt. Wells (1984) beschreibt bei einer Corexit 9527-Konzentration von 1 mg/l letale Effekte besonders bei empfindlichen Jungstadien von Coelenteraten, Fischarten wie dem Kabeljau (*Gadus morhua*) und Seeigeln (*Paracentrotus*). Auch zunächst nicht sichtbare, subletale Effekte kann ein Dispergatoreintrag ins Biotop bei den Organismen hervorrufen. Es werden Einflüsse auf das Wachstum, die Reproduktion und das Verhalten festgestellt (Wells, 1984).

Die in den Laborexperimenten festgestellte günstige Wirkung von THL im Falle einer Kohlenwasserstoffkontamination wurde bei den Freilandarbeiten nicht festgestellt. Die Ölabbauraten wurden durch THL nicht gesteigert. In den Freilandexperimenten wurde nachgewiesen, daß THL die Ölimination aus dem Sediment fördert, verbunden mit einer

geringen Eigentoxizität (Höpner et al., 1985a). Zusätzlich beschrieb v. Bernem (1984) einen positiven, "imprägnieren-den" Effekt des THL auf Wattflächen bei prophylaktischer Anwendung. Aus diesen Gründen ist der Einsatz von THL bei einer Ölkontamination der Wattflächen u.U. in Kombination mit anderen Ölbekämpfungsmaßnahmen empfehlenswert.

Ein weiterer wichtiger Aspekt für Bekämpfungsmaßnahmen ist die in den Freilanduntersuchungen von uns festgestellte Sensitivität der Schlickwattoberfläche gegenüber mecha-nischen Störungen. Intensive Begehung (s. Abb. 5, 7 und 8) der Versuchsflächen zu Testbeginn sowie mechanische Bear-beitung verursachten sowohl bei den Testflächen 1.1. - 1.5. als auch bei 2.1. - 2.5. ein Absinken der Keimzahlen (s. Abb. 10). Eine ähnliche oder auch intensivere Störung und damit auch der Mikroorganismen kann daher für mecha-nische Bearbeitungen von Ölkontaminationen (s. Breuel, 1981 u. Abb. 39) vermutet werden.

Zur Überprüfung der Frage, ob die Lebendkeimzahlbestim-mungen der Freilanduntersuchungen, die stets mit Proben der Sedimentoberfläche stattfanden, auch gegen Versuchs-ende, wo die Sand-öl-Zusätze-Schichten bereits einige cm tief ins Sediment eingedrungen waren, noch repräsentativ waren, wurden exemplarisch für die Testflächen Tiefen-profile (Felder 2.5. und 3.2., s. Abb. 12) erstellt. Bei beiden Feldern wurden die maximalen Lebendkeimzahlkonzentrationen jeweils direkt über der ölschicht gemessen. Das Wachstum der ölabbauenden Mikroorganismen wird durch die Nähe des Substrats stimuliert - unter der Voraussetzung der ausreichenden Sauerstoffversorgung. Der Reduktions-horizont war hier identisch mit dem ölhorizont (Höpner et al., 1985b). Das unterschiedliche Verhalten der beiden mit öl kontaminierten Testfelder (2.5. und 3.2.) hinsicht-lich der Oberflächenkeimzahlen (s. Kap. 3.1. und Abb. 12) läßt sich vermutlich auf die Position des ölhorizonts zurückführen, der bei den Testflächen 3.1. - 3.5. gegen

Versuchsende ca. 2-3 cm tiefer lag, als bei den Flächen 2.1. - 2.5.. Je tiefer der Ölhorizont im Laufe der Zeit absinkt, desto weniger werden die Oberflächenkeimzahlen von den Auswirkungen betroffen. Das heißt, bei den Testflächen 2.1. - 2.5., wo sich die Ölhorizonte am Versuchsende erst in 2 cm Tiefe befanden, können die gemessenen Oberflächenkeimzahlen - wie auch das Tiefenprofil zeigt - noch als repräsentativ gelten. Dieselbe Frage erhebt sich für die Testflächen 3.1. - 3.5.. Wie aus Abb. 13 ersichtlich, ist erst am Versuchsende (17.12.84) nahezu kein Öl mehr an der Oberfläche nachweisbar (zu diesem Zeitpunkt wurden auch die Tiefenprofile erstellt). Von daher ist zu vermuten, daß während des vorhergehenden Meßzeitraums, wo die Ölschicht noch nicht so tief abgesunken war, bzw. sich noch größere Teilmengen in oberflächennahen Schichten befanden (s. Abb. 13), für die Feldbehandlung repräsentative Lebendkeimzahlproben gezogen wurden. Ob diese Lebendkeimzahlbestimmungen gegen Versuchsende aber in allen Fällen die Auswirkung der Feldbehandlung widerspiegeln, ist fraglich. Wie in Abb. 12 ersichtlich, werden die negativen Auswirkungen des exemplarisch für die Dispergatoren gemessenen Öl-Corexit-Gemisches auf die Keimzahlen im Tiefenprofil des Feldes 3.3. deutlich. Der Wert der Oberflächenprobe wird in diesem Fall offensichtlich nicht mehr von dem Detergenz beeinflusst, er liegt in vergleichbarer Höhe wie beim Feld 3.1.b (Sandauflage, s. Abb. 11a und 11b). Die Hauptmenge des Öl-Corexit-Gemisches befand sich zu diesem Meßzeitpunkt in ca. 3 cm Tiefe (s. Abb. 13). Diese Tiefe war hier also offensichtlich ausreichend, um die Oberflächenproben von den bereits diskutierten bakterioziden bzw. bakteriostatischen Eigenschaften des Öl-Detergenz-Gemisches abzuschirmen. Wie Abb. 13 zeigt, änderte sich die Position der Ölhorizonte unter Dispergatoreinfluß zum Versuchsende hin ständig. Bei der Corexitbehandlung beispielsweise wird ein Absinken des Ölhorizontes gefolgt von einem Wiederanstieg. Obwohl also besonders zum Versuchsende nicht mehr für jede Probe die

volle Auswirkung der Feldbehandlung auf die Lebendkeimzahlen garantiert werden kann, stimmen dennoch u.a. die Resultate des Tiefenprofils des mit Öl-Corexit behandelten Feldes mit den Langzeitbeobachtungen überein, und zwar hinsichtlich der keimzahlhemmenden Wirkung des Öl-Corexit-Gemisches.

Unter Berücksichtigung der bereits diskutierten biotischen und abiotischen Faktoren, die die Lebendkeimzahlbestimmung bei Felduntersuchungen ebenfalls beeinflussen, ist die eben behandelte Frage der Repräsentativität der Oberflächenkeimzahlen ebenfalls einzuordnen. Auch bei sehr kritischer Betrachtung der Resultate der Freilanduntersuchungen sind dennoch Tendenzen interpretierbar.

In Hinblick auf die bereits auf S. 144 erwähnte Ölbe-kämpfungsstrategie wurde die Flüssiginkubation der Tiefenprofile der Felder 2.4. und 2.5. vorgenommen. Sie sieht vor, den Wattboden mechanisch umzupflügen und den Ölabbau durch die Sauerstoffzufuhr auf natürliche Weise zu beschleunigen, unter der Voraussetzung, daß genügend mobilisierbare Ölabbauende Mikroorganismen in den betreffenden Biotopen vorliegen. Nach den Resultaten der Flüssiginkubation war das Vermehrungspotential der Mikroorganismen in den tieferen Schichten voll erhalten geblieben. Ölzugabe, verbunden mit Sauerstoffzufuhr, steigerte die Lebendkeimzahlen um durchschnittlich 10^5 N/g Trockensediment und zwar ohne Unterschiede der einzelnen Sedimentschichten (bis 5 cm Tiefe).

Eine mechanische Bearbeitung der sensitiven Wattoberfläche hat - wie bereits diskutiert - ein Absinken der Lebendkeimzahlen zur Folge. Dieser Keimzahlverlust bewegt sich jedoch nur im Bereich ca. einer Zehnerpotenz und würde durch den Keimzahlanstieg - hervorgerufen durch Sauerstoffzufuhr mehr als kompensiert! Davon ausgehend kann für den dünn-schichtigen Ölunfall auf Wattflächen - sofern es technisch durchführbar ist - von der mikrobiologischen Seite her eine mechanische Agitation der Sedimentober-

fläche empfohlen werden. Höpner et al. (1987) schlugen für diesen Fall flachgehende, bei Hochwasser operierende Boote vor, die mit Dredgen oder Druckwasser operieren. Gelänge es, den Sauerstoffmangel auf diese Weise zu beheben, würden aber vermutlich wiederum die Nährstoffe limitierend wirken (s.o., Kap. 3.1., 3.2. und Höpner et al., 1987). Eine Kombination beider Faktoren wäre sinnvoll.

Aus den in den Laborversuchen gemessenen Werten des Kohlenwasserstoffabbaus und der parallel gemessenen Lebendkeimzahlen konnte die Abbauleistung pro Mikroorganismenzelle unter aeroben Bedingungen kalkuliert werden. Zusammen mit der Ermittlung der Kohlenwasserstoffabbauraten sollten diese Daten als "Faustformelwerte" den Zeitbedarf der Erholung des Ökosystems nach einem Ölunfall abschätzen helfen. Dabei wurde von der Annahme ausgegangen, daß bei den Versuchen mit Schlicksediment zusammengefaßt und jeweils über die gesamten Versuchsläufe gesehen eine Keimkonzentration von 10^6 N/g Trockensediment vorliegt (s. Abb. 22a,b) mit einem durchschnittlichen Anteil von 80 % öloidierenden Mikroorganismen. Die ermittelten Abbauleistungen betragen (jeweils unter Nährstoffzusatz (N,P) und bei 16 °C) $1,3 \times 10^{-7}$ mg Öl/Zelle/Tag bzw. $1,5 \times 10^{-7}$ mg Hexadecan/Zelle/Tag. Die Abbauleistung pro Zelle ist erwartungsgemäß bei Hexadecan etwas höher als beim komplexen Kohlenwasserstoffgemisch Öl. ZoBell (1949) errechnete bei vergleichbaren Untersuchungen eine Ölabbauleistung von durchschnittlich $2,16 \times 10^{-10}$ mg/Zelle/Tag, allerdings bei einer Inkubationstemperatur von 27 °C. Um diesen Wert mit unseren Untersuchungen vergleichen zu können, wurde ein Q_{10} -Wert (Temperatur-Koeffizient zwischen 3 - 37 °C) von 2,3 (ZoBell, 1949: 2,3; Gibbs et al., 1975 und Gibbs & Davis, 1976: 2,7; Dibble & Bartha, 1979: 1,7) angenommen. Daraus ergibt sich für die von ZoBell (1949) gemessenen Werte eine Ölabbauleistung von $9,4 \times 10^{-11}$ mg/Zelle/Tag bei 17 °C. Somit liegt die in unseren Versuchen ermittelte Ölabbauleistung um den Faktor

1000 höher als der von ZoBell (1949) angegebene Wert. Der in den Laborversuchen ermittelte Kohlenwasserstoffabbau im aeroben Schlickwatt übersteigt alle bisher gemessenen Werte bei weitem (s. Tab. 1). Der durchschnittliche Abbauwert in unseren Experimenten beträgt 5 mg pro Ansatz mit 50 g Trockensediment. Das ergibt eine Abbaurrate von $100 \text{ g/m}^3/\text{Tag}$ oder $36 \text{ kg/m}^3/\text{Jahr}$. Gibbs (1975) fand bei seinen Untersuchungen im aeroben Seewasser eine Abbaurrate von $30 \text{ g/m}^3/\text{Jahr}$. Dieser enorme Unterschied im Abbau läßt sich auf die Sedimentstruktur des Schlicks zurückführen. Die sehr große Oberfläche der Schlickpartikel bietet sowohl Kohlenwasserstoffen als auch den ölabbauenden Mikroorganismen viele Adsorptionsmöglichkeiten (Kant et al., 1985). Diese Adsorptionsmöglichkeiten fallen beim Sandsediment wesentlich geringer aus, da hier die Oberfläche im Verhältnis zum Volumen der Sandpartikel wesentlich kleiner als beim Schlick ist. Entsprechend gering fallen auch die Abbauraten aus, die im Zeitraum unserer Versuche nicht einmal meßbar waren.

Kant et al. (1985) vermuteten, daß eine Adsorption an genügend große Oberflächen eine bessere Voraussetzung für den Kohlenwasserstoffabbau bietet als die Emulsion in einer flüssigen Phase. Wohlbemerkt gelten diese enorm hohen Abbauraten stets nur für das aerob gehaltene Schlickwatt.

Untersuchungen im Freiland (Gassmann & Gunkel, 1983) zeigten dagegen beim Sandwatt einen schnelleren Kohlenwasserstoffabbau als beim Schlickwatt, verbunden mit einer höheren Zahl an öloxydierenden Mikroorganismen. Das Sandwatt ist aufgrund seiner Partikeleigenschaften wesentlich besser sauerstoffversorgt als das Schlickwatt, der Kohlenwasserstoffabbau wird hier letztendlich über die Sauerstoffversorgung reguliert. Gelänge es im Freiland, das Schlickwatt bei einer Kohlenwasserstoffkontamination aerob zu halten, durch die bereits diskutierten Methoden der Sauerstoffeinbringung ins Sediment, wäre mit hohen Abbauraten zu rechnen!

In der Diskussion um Ölbekämpfungsstrategien steht eine Methode, die bei einem Ölunfall das "Aussäen" von öl-oxidierenden Mikroorganismen in dem betroffenen Biotop vorsieht (Atlas, 1977; Tagger et al., 1983; Gunkel, 1984). Diese Maßnahme soll den mikrobiologischen Kohlenwasserstoffabbau im Sediment fördern. Die prinzipielle Eignung dieser für das Freiland umstrittenen Maßnahme (s. Kap. 1) wurde hier im "geschlossenen" System (Laborversuch) überprüft. Die Versuche wurden mit dem bereits in den Feldversuchen gewählten Schlickwatt-Sediment aus dem Vareler Watt (s. Abschnitt 2.6.) durchgeführt und es wurde mit einer "natürlich" in dem betreffenden Biotop vorhandenen Mischpopulation gearbeitet. Das untersuchte Sediment stammte, wie bereits beschrieben, aus einem ständiger Kohlenwasserstoff-Belastung ausgesetzten Gebiet, daher war bei den Mikroorganismen eine Öladaption bzw. Verschiebung des Artenspektrums zugunsten öloxidierender Arten wahrscheinlich (s.o.). Bei dieser Mischpopulation wurde eine Statfjordöl-Adaption durchgeführt mit einer im Vergleich zum natürlichen Biotop relativ hohen Ölkonzentration von 1 % (v/w) (s. Abschnitt 2.4.2.). Damit sollte ein gegenüber der "natürlichen" Population noch weiter erhöhter Anteil an Kohlenwasserstoff-Oxidierern (möglichst 100 %) erreicht werden. Erst mit dieser Voraussetzung konnte die o.g. Fragestellung, ob ein Aussäen öloxidierender Mikroorganismen bei einem Ölunfall sinnvoll ist, untersucht werden. Die Statfjordöl-adaptierten Mikroorganismen werden im folgenden Text auch als "stark öladaptierte" Population im Gegensatz zu der "natürlichen" lediglich "öladaptierten" Population bezeichnet. Der Terminus "stark öladaptierte" Population wurde gewählt, da aufgrund der diskutierten Problematik der Lebendkeimzahlbestimmungen nur angenommen werden konnte, daß es sich um eine ausschließlich aus öl-oxidierenden Arten zusammengesetzte Population handelte. Generell laufen in der Öladaptationsphase verschiedene Prozesse innerhalb der Population ab. Änderungen in der Biomasse, taxonomische Verschiebungen der Population oder

physiologische Veränderungen bei den einzelnen Arten wurden beobachtet (Floodgate, 1984). In welchem Ausmaß die einzelnen Prozesse ablaufen, ist natürlich abhängig von Art und Menge der zugefügten Kohlenwasserstoffe, des Populationszustandes vor der Kontamination sowie abiotischer Umweltbedingungen.

In den Experimenten wurde die stark öladaptierte Population in definierten Titern sterilisiertem Wattsediment zugefügt, so daß eine Konkurrenz der natürlicherweise im Sediment vorhandenen Mikroflora entfiel. Mit dieser Versuchskonstellation sollte die Abbaugeschwindigkeit stark öladaptierter Mikroorganismen im "geschlossenen" System überprüft werden und zusätzlich, ob die zum Versuchsstart vorliegenden Lebendkeimzahlhöhen (TCFU) die Ölabbau-geschwindigkeit beeinflussen.

Die Resultate ergaben, daß die Ansätze mit dem Starttiter 10^4 N/g Trockensediment innerhalb kurzer Zeit dieselbe Lebendkeimzahlhöhe erreichten wie beim Ansatz mit 10^6 N/g Trockensediment (s. Abb. 22a+b). Unabhängig von der zum Versuchsstart vorliegenden Lebendkeimzahl lag die maximal erreichte Endkeimzahl zwischen 10^7 und 10^8 N/g Trockensediment.

Wie Abbildungen 22a und 22b zeigen, lagen die während des Versuchsablaufs ermittelten Lebendkeimzahlwerte durchschnittlich höher als bei der "natürlichen" Population. Die Werte der "natürlichen" Population näherten sich ca. ab dem 30. Inkubationstag den Werten der stark öladaptierten Population an. Die Statfjordöl-adaptierte Population war der "natürlichen" Population gegenüber nicht nur durch ölbedingte Adaptationsmechanismen im Vorteil, sondern auch z.B. hinsichtlich der Gewöhnung an die Inkubationsbedingungen, was das unterschiedliche Keimzahlverhalten erklären könnte.

Betrachtet man parallel zu der Keimzahlentwicklung die Kohlenwasserstoffabbauraten, so ließ sich weder durch starke Öladaption der Mikroorganismen noch durch Titererhöhung eine Steigerung der Abbaugeschwindigkeit erreichen (s. Abb. 23a+b).

Geht man von der bereits diskutierten Tatsache aus, daß bei der "natürlichen" Population mit einem hohen Anteil öloxidierender Mikroorganismen an der Gesamtpopulation zu rechnen ist und dieser Anteil im Falle der stark öladaptierten Population weiter gesteigert wurde (vermutlich bis zu 100 %), läßt sich feststellen, daß eine höhere Zahl an öloxidierenden Mikroorganismen nicht unbedingt mit einem höheren Abbau gekoppelt sein muß. Wie Gunkel (1984) darstellt, kommt es auch auf die Aktivität der einzelnen öloxidierenden Arten an. Eine Keimzahlbestimmung öloxidierender Mikroorganismen läßt also nur bedingt auf das Ausmaß ihres Abbauvermögens zurückschließen. Die Populationszusammensetzung ist ebenso von entscheidender Bedeutung.

Die durchgeführten Untersuchungen konnten also die Ansichten von Tagger et al. (1983) sowie Gunkel (1984) bestätigen. Ein "Aussäen" öladaptierter Mikroorganismen bei einem Ölunfall ist überflüssig, da die Abbauraten nicht gesteigert werden können. Dabei ist zu bedenken, daß bei den von uns durchgeführten Untersuchungen die Konkurrenz durch die "natürliche" Population ausgeschaltet war. Diese idealen Bedingungen liegen im Freiland nicht vor. Der Anteil am Kohlenwasserstoffabbau, der dann auf die künstlich ausgesäten Mikroorganismen zurückzuführen wäre, würde durch rasches Überwachsen durch die natürliche Population weiter minimiert und so verbietet sich diese Ölbekämpfungsstrategie von selbst. Die natürlicherweise im Sediment vorhandene Population ist nach einer Anpassungszeit in der Lage, kontaminierende Kohlenwasserstoffe abzubauen. Bei Proben aus relativ unverschmutzten Arealen wäre mit einer längeren Adaptationszeit, d.h. in der Anfangsphase auch geringeren Abbauraten, zu rechnen. Aber aufgrund der Tat-

sache, daß öloxidierende Mikroorganismen ubiquitär sind und ihre enzymatische Kapazität, Öl abzubauen stets vorhanden ist, wären sie selbst in diesem Fall langfristig einer artifiziell in das Biotop eingebrachten Population aufgrund der besseren Anpassung an die vorliegenden Umweltbedingungen überlegen (Atlas, 1981).

Zusammenfassende Empfehlungen zu Ölbekämpfungsmaßnahmen

1. Eine Stickstoff- und Phosphatdüngung dünnflächig mit Öl kontaminierter Schlickwattflächen ist von der mikrobiologischen Seite her überflüssig.
2. Wird dasselbe Sediment aerob gehalten durch z.B. regelmäßiges Umpflügen der Sedimentoberfläche z.B. mit Hilfe von Booten aus operierenden Dredgen oder Druckluft, ist eine zusätzliche Nährstoffversorgung der Mikroorganismen notwendig.
3. Die Anwendung dieser Ölbekämpfungsmaßnahme kann aus mikrobiologischer Sicht empfohlen werden, da auch in tiefen Sedimentschichten (bis 5 cm Tiefe gemessen) ein unter Sauerstoffzufuhr mobilisierbares großes Potential an öloxidierenden Mikroorganismen vorliegt (und daher die Gefahr des "Unterpflegens" der an der Sedimentoberfläche aktiven Öloxidierer nicht besteht). Zusätzlich steigen die mikrobiellen Ölabbauraten im aerob gehaltenen Schlickwatt auf höchste, bisher in der Literatur nicht bekannte Werte.
4. Ein zusätzliches "Aussäen" öloxidierender Mikroorganismen bei einem Ölunfall ist aufgrund des hohen Ölabbau Potentials der Wattflächen überflüssig.

5. Vom Einsatz der geprüften Dispergatoren Corexit 9527 und Metryl OD ist dringend abzuraten. Der Einsatz von THL ist von der mikrobiologischen Seite her nicht notwendig, kann aber aus prophylaktischen Gründen u.U. in Kombination mit anderen Ölbekämpfungsmaßnahmen sinnvoll sein.

4.2. Diskussion des Keimzahlbestimmungsverfahrens für ölabbauende Mikroorganismen unter besonderer Berücksichtigung von Sedimenten

Werden Ökosysteme mit Öl kontaminiert, verändert sich die mikrobielle Population durch selektive Anreicherung öl-oxidierender Mikroorganismen. Entsprechend kann der Anteil ölabbauender Mikroorganismen an der Gesamtmikroorganismenpopulation z.B. als Indikator für latente Ölverschmutzungen dienen oder zur Beurteilung des ölabbaupotentials eines Ökosystems herangezogen werden (s. Abschnitt 1. und 4.1.). Im Laufe der Jahre wurden daher verschiedene Methoden zur Bestimmung der Zahl ölabbauender Mikroorganismen entwickelt und eingesetzt. Zu diesen Methoden gehört u.a. die Ermittlung der Kolonienzahlen auf ölhaltigen Festmedien.

Unsere Ergebnisse (s. Abschnitt 3.4.1.) zeigen, daß das Ausplattieren von Mikroorganismensuspensionen (aus Wattproben) auf mit Agar verfestigten Ölmedien ein Verfahren ist, das die aus den gebildeten Kolonien berechnete Keimzahl ölabbauender Mikroorganismen verfälscht. In 75 % aller untersuchten Ansätze waren die Keimzahlen auf ölfreiem Agarmedium höher als auf ölhaltigem. Diese Erhöhung betrug im Durchschnitt 66 %. Als C-Quellen dienten übertragener Kohlenstoff und Agar. Wir fanden also eine Hemmung der Koloniebildung durch Öl anstatt der Abhängigkeit der Bildung von Kolonien von Öl als C-Quelle. Il'inski et al. (1979) zeigten, daß auf ölhaltigen Silikagel-Medien verglichen mit Agar-Medien lediglich 50 % der

von ihnen getesteten Mikroorganismenstämme aufwuchsen und somit die "wahren" Ölabbauenden Mikroorganismen waren. Silikagel wurde z.B. bereits 1973 von Seki und von Walker & Colwell (1975) zur Verfestigung der Ölmedien verwendet, um das Aufwachsen von Mikroorganismen zu unterbinden, die Agar als C-Quelle nutzen können. Problematisch bei der Verwendung von Festmedien zur Ermittlung der Keimzahl ölabbauender Mikroorganismen ist weiterhin, daß unter diesen Bedingungen der Kontakt zwischen Mikroorganismen und dem Öl als Substrat nicht ausreichend gewährleistet wird. Es kann nicht erwartet werden, daß Mikroorganismen auf festen Ölmedien ebenso vermehrungsfähig sind wie in Flüssigkulturen. Feste Nährböden sind somit für die Ermittlung ölabbauender Mikroorganismen als ungeeignet anzusehen. Dies wurde auch von Gunkel & Minas (1985) nochmals ausdrücklich betont.

Eine geeignete Vorgehensweise ist dagegen das in Flüssigmedien durchgeführte Most-probable-number (MPN)-Verfahren. Das MPN-Verfahren wurde ursprünglich für die Bestimmung des Titers coliformer Bakterien in Wasser entwickelt und ist 1920 als Standardmethode anerkannt worden. Im Laufe der Jahre wurde das Verfahren modifiziert und anhand von statistischen Kalkulationen verbessert (Standard methods for the examination of water and waste water, 1985). Von Alexander (1965) wurde die MPN zur quantitativen Erfassung von Mikroorganismen in Sedimenten erweitert. Das MPN-Verfahren ist nicht nur allgemein zur Bestimmung von Keimzahlen geeignet, sondern kann je nach Zusammensetzung des Mediums und entsprechenden Inkubationsbedingungen spezifisch Mikroorganismen erfassen (Gunkel & Oppenheimer, 1963; Gunkel & Rheinheimer, 1968). Für die Erfassung der Konzentration ölabbauender Mikroorganismen in Sediment entwickelten Gunkel & Trekel (1967) ein modifiziertes MPN-Verfahren. Vergleichende Untersuchungen zu den verschiedenen Bestimmungsmethoden ölabbauender Mikroorganismen (insbesondere von Festmedien- und MPN-

Verfahren) wurden z.B. von Walker & Colwell (1976) und Mills et al. (1978) durchgeführt.

Das MPN-Verfahren dient zur Abschätzung der Organismendichte. Die Ermittlung der Keimkonzentrationen in wässrigen Medien anhand des MPN-Verfahrens basiert dabei auf folgenden grundlegenden Voraussetzungen:

- Die Keime liegen zufällig verteilt und einzeln vor.
- Das gewählte Medium inhibiert das Wachstum der zu bestimmenden Organismen nicht.
- Ein oder mehr Keime erzeugen ein als Trübung sichtbares Wachstum.
- Die Trübung ist zweifelsfrei erkennbar.

Die Berechnung der MPN von Mikroorganismen erfolgt aufgrund ihrer Vermehrung und der daraus resultierenden Trübung der mit verschiedenen Organismenkonzentrationen inkubierten Medien. Die Wahrscheinlichkeit P_{neg} , daß sich in der gewählten Probe kein Organismus befindet, ist:

$P_{neg} = e^{-ax}$. Das Medium bleibt ungetrübt. Die Wahrscheinlichkeit P_{pos} , daß sich in der Probe ein oder mehr Organismen befinden, ist somit $P_{pos} = 1 - e^{-ax}$. Wählt man z.B. drei verschiedene Verdünnungen, kann der Wert der MPN durch folgende Beziehung wiedergegeben werden (Halvorson & Ziegler, 1933a):

$$a_1n_1 + a_2n_2 + a_3n_3 = \frac{a_1p_1}{1-e^{-a_1x}} + \frac{a_2p_2}{1-e^{-a_2x}} + \frac{a_3p_3}{1-e^{-a_3x}},$$

wobei a den Verdünnungsfaktor der angeimpften Mikroorganismensuspension aus Verdünnung 1, 2 bzw. 3, n die Anzahl der Parallelen pro Verdünnung (Stichprobenumfang), p die Anzahl der Parallelen, die Wachstum (Trübung) aufzeigen, und x die Anzahl der Mikroorganismen in der Ausgangssuspension bedeuten.

Zur Erleichterung der Ermittlung von Mikroorganismenkonzentrationen wurden MPN-Werte für unterschiedliche Verdünnungsschritte und Anzahlen von Parallelen pro Verdünnung bzw. deren Kombination errechnet und tabelliert (z.B. Standard methods for the examination of water and wastewater, 1985).

Die Präzision der MPN ist abhängig von der Anzahl der Parallelen pro Verdünnungsstufe, von der Anzahl der eingesetzten Verdünnungen sowie von der Größe der Verdünnungsschritte. Ausführliche statistische Kalkulationen sind z.B. von Halvorson & Ziegler (1933a,b) sowie von Cochran (1950) durchgeführt worden. In der Praxis werden üblicherweise fünf parallele Kulturen und Zehntelungsverdünnungen eingesetzt. Für diese Situation liegt der wahre Wert der MPN für 95 % statistische Sicherheit innerhalb der Konfidenzintervallsgrenzen, transformiert in relative Werte, von 30 % bis 360 % (Oberzill, 1967). Beim Einsatz von 40 Parallelkulturen liegt der wahre Wert noch zwischen 62 % und 147 % (Halvorson & Ziegler, 1933b). Da die mathematische Analyse von der Erfüllung der anfangs genannten Bedingungen ausgeht und somit nicht der praktischen Situation entspricht, wird die Präzision der Methode letztendlich überschätzt (Cochran, 1950).

Bei der quantitativen Erfassung ölabbauender Mikroorganismen nach dem MPN-Verfahren in ölhaltigen Medien wurden die statistischen Kalkulationen der "Basis"-MPN-Methode angewendet. Wir sind jedoch der Ansicht, daß folgende Situationen nicht ohne Einfluß auf die Präzision des ölabbauer-MPN-Verfahrens sind. So führt die beim Wachstum ölabbauender Mikroorganismen zunehmende mikrobielle Dispergierung des öls zu Mikrotröpfchenbildung. Das Inkubationsmedium erhält eine zusehends bräunliche Färbung, woraus resultierend die visuelle Feststellung der Trübung durch Organismenwachstum verfälscht werden kann. Als Weiteres werden sich Mikroorganismen, die sich während des

Wachstums an oder in Öltröpfchen assoziieren, einer Bestimmung anhand von Trübung entziehen. Diese Situationen wurden z.B. von Heyer (1966) und Gunkel (1967) angesprochen. Horowitz et al. (1975) beobachtete, daß sich die Mikroorganismen im Verlauf der stationären Wachstumsphase wieder von den Öltröpfchen ablösen. Die Bewertung der MPN-Kulturen wird in der stationären Wachstumsphase vorgenommen. Es ist also auch möglich, daß der Fehler, der auf an Öl assoziierten Mikroorganismen basiert, geringen Einfluß auf die ohnehin große Schwankungsbreite der Ölabbauerkeimzahlen nach dem MPN-Verfahren hat. Statistische Analysen der MPN Ölabbauender Mikroorganismen, die diese Situationen berücksichtigen, waren der Literatur nicht zu entnehmen.

Diese Arbeit steht im Zusammenhang mit der Entwicklung von Bekämpfungsstrategien bei Ölkontamination in Wattsedimenten (Höpner et al., 1985a). Im Hinblick auf diese Strategien bestand u.a. der Bedarf, möglichst rasch Ölabbauerkeimzahlen zu erhalten, um z.B. das Ölabbau-potential des betroffenen Bereiches abschätzen und Maßnahmen empfehlen zu können. Das bisher angewandte Ölabbauer-MPN-Verfahren (Gunkel & Trekel, 1967) erfüllt diesen Bedarf nicht, da es eine Inkubationsdauer von 21 Tagen (18 °C) einschließt. Unser Ziel war es nun, ein Verfahren zu entwickeln, das es zuläßt, die Keimzahl Ölabbauender Mikroorganismen in relativ kurzer Zeit und mit höherer Präzision als z.B. durch das MPN-Verfahren zu bestimmen.

Voraussetzung für die quantitative Erfassung von Mikroorganismen in Sedimenten ist eine geeignete Methode zur Abtrennung der Organismen vom Sediment sowie zur Zerteilung von Organismenaggregaten. Für die Ermittlung von Lebendkeimzahlen der von uns untersuchten Schlicksedimente erwies sich der Einsatz von 0,5 % (v/v) TWEEN 80 als geeignet (s. Abschnitt 3.3.). 0,5 % (v/v) TWEEN 80 erzielte

bei den beiden geprüften Sedimentsuspensionen eine einheitliche Oberflächenspannung von $0,044 \text{ Nm}^{-1}$ (s. Tab. 6). Die ablösende bzw. zerteilende Wirkung der oberflächenaktiven Substanz TWEEN 80 basiert auf Reduktion der Oberflächenspannung. Gleichzeitig ergibt sich aber das Problem, daß zu geringe Oberflächenspannungen auf Mikroorganismen hemmend ($< 0,045 \text{ Nm}^{-1}$) oder gar letal ($0,025\text{--}0,035 \text{ Nm}^{-1}$) wirken können (Perry, 1984; ZoBell, 1969). Buck & Cleverdon (1961) wiesen auf inhibitorische Effekte bereits geringer Konzentrationen von TWEEN 80 auf marine Organismen hin. Jones & Jannasch (1959) beobachteten zudem beim Einsatz von TWEEN 80 in Seewasser in Konzentrationen von 0,1 bzw. 1,0 % (v/v), daß sich nur noch farblose Kolonien entwickelten. Sie vermuteten daher, daß TWEEN 80 in diesem Konzentrationsbereich auf bestimmte marine Mikroorganismen toxisch wirkt und lediglich resistente Arten auf den Agarplatten wiedergefunden werden. Eine solche Selektion durch TWEEN 80 zeigte sich bei unseren Untersuchungen mit Sediment nicht. Weder nach Ultraschall- noch nach TWEEN 80-Behandlung ergaben sich Hinweise auf eine tendenzielle Reduzierung oder gar Eliminierung gefärbter Kolonien auf den Agarplatten. Der prozentuale Anteil chromogener Mikroorganismenkolonien schwankte in allen Fällen zwischen ca. 20 und 90 %. Die für Untersuchungen mit Seewasser beschriebenen inhibitorischen und selektiven Wirkungen von TWEEN 80 konnten für unsere Sedimentproben nicht bestätigt werden. Offenbar steht die Wirkungsweise eines Verfahrens zur Abtrennung von Mikroorganismen und/oder zur Zerteilung von Mikroorganismenaggregaten im engen Zusammenhang mit dem zu behandelnden Material. Darauf wies auch Gunkel (1964) hin. So erscheint es sinnvoll, das Verfahren dem jeweiligen Versuchsmaterial anzupassen, wobei allerdings das Problem der Vergleichbarkeit mit Daten, resultierend aus anderen Behandlungsvorfahren, zu bedenken ist.

Vorrangig bei diesem Verfahren zur Ermittlung von Ölabbauerkeimzahlen war, das Öl von der wässrigen Phase zu separieren sowie an Öl assoziierte Mikroorganismen abzutrennen. Dies gelang weitestgehend durch den Einsatz von 10 % (v/v) Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4), einem mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel (s. Abschnitt 3.4.3.). Die Öl- CCl_4 -Fraktion war dabei die untere, was die ölfreie Entnahme der wässrigen, mikroorganismenhaltigen Fraktion erleichterte. Der Einsatz von 10 % (v/v) CCl_4 wurde für die Klasse der leichten Öle geprüft. Diese Menge Lösungsmittel ist geeignet, Rohöl in Konzentrationen von 0,05 % bis 10 % (v/v) aus dem Inkubationsmedium abzutrennen. Zur quantitativen Erfassung ölabbauender Mikroorganismen wird den Medien üblicherweise 1 % (v/v) Öl zugesetzt (Gunkel & Trekel, 1967). 10 % (v/v) CCl_4 bewirkt eine Abtrennung des Öls aus der wässrigen Phase sowohl ohne als auch bei Anwesenheit von Mikroorganismen. Reste von Lösungsmitteln im Überstand (Medium ohne Mikroorganismen) führen zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der optischen Dichte von durchschnittlich 3 % (s. Abschnitt 3.4.4.). Bei turbidimetrischen Messungen unter Anwesenheit von Mikroorganismen erhielten wir aber nach der Abtrennung des Öls eine Erniedrigung der optischen Dichte von durchschnittlich 2 %, was einem Verlust an Mikroorganismen von durchschnittlich 9 % entsprach. Mikroorganismen, die sich in der wässrigen Phase befinden, werden also bei vorsichtigem Hinzufügen von CCl_4 nur im geringen Umfang mit in die Öl- CCl_4 -Phase gerissen. An Öltröpfchen assoziierte Mikroorganismen konnten durch den Einsatz von CCl_4 in die wässrige Phase überführt werden. Die gewählte 48 h Inkubationsdauer zum Anhaften der Organismen an das Öl kann dabei als ausreichend angesehen werden. Da öladaptierte Mikroorganismen eingesetzt wurden, waren sie bereits nach wenigen Stunden in der exponentiellen Wachstumsphase. Horowitz et al. (1975) beschreiben, daß während der exponentiellen Wachstumsphase die meisten ölabbauenden Mikroorganismen an Öltröpfchen assoziiert vorgefunden werden.

Tetrachlorkohlenstoff führt weder zu Deformationen noch zur Lyse der Mikroorganismen (s. Abb. 27 und Abb. 28). Diesbezügliche Einflüsse auf die quantitative Erfassung von Keimen durch Messung der optischen Dichte oder mit der Zählkammer sind nicht zu befürchten. Die Anwendung von CCl_4 hat geringen Einfluß auf die Variabilität der Keimzahlwerte sowohl aus Zählkammer-Bestimmung als auch aus turbidimetrischer Messung (s. Abb. 30a,b und Abb. 31a,b). Dies zeigt sich deutlich anhand des Vergleichs der Konfidenzintervalle für 95 % statistische Sicherheit, hier in relative Werte bezogen auf das jeweilige arithmetische Mittel transformiert angegeben: Der Erwartungswert der Keimzahlen, ermittelt mit Hilfe der Zählkammer, liegt vor CCl_4 zwischen 80 % und 120 %, nach CCl_4 zwischen 81 % und 119 %. Der Erwartungswert der Keimzahlen aus turbidimetrischen Messungen liegt vor CCl_4 zwischen 98 % und 102 %, nach CCl_4 zwischen 95 % und 105 %.

Die Korrelationskoeffizienten (r) der Zufallsvariablen X (optische Dichte) und Y (N/ml, gezählt) weisen auf die lineare Abhängigkeit der Variablen sowohl vor ($r = 0,973$) als auch nach ($r = 0,970$) CCl_4 -Behandlung hin. Der Unterschied der Meßwertpaare vor zu nach CCl_4 ist statistisch nicht signifikant, wie sich anhand der Überprüfung der Regressionskoeffizienten ergab. Das Lösungsmittel CCl_4 ist somit prinzipiell geeignet, Öl aus der wässrigen Phase abzutrennen und Mikroorganismen für die quantitative Erfassung mittels optischer Dichte oder Zählkammerzählung "bereitzustellen". Ist Öl allerdings durch exkretierte Biotenside emulgiert, trennen selbst 10 % (v/v) CCl_4 das Öl nicht mehr ausreichend von der wässrigen Phase ab (s. Abb. 33). Je nach Intensität der Emulgation führt dies dazu, daß die turbidimetrischen Meßwerte starken Schwankungen unterliegen bzw. eine OD-Messung letztendlich unmöglich ist. Aufgrund des unterschiedlichen optischen Verhaltens von Öltröpfchen bzw. Lösungsmittelresten und Mikroorganismen sind bei der Zählkammerzählung dagegen

keine Einflüsse auf die Präzision vorhanden. Bei der Inkubation von ölabbauenden Mikroorganismen in ölhaltigen Flüssigmedien findet eine solche Dispergierung des Öls in Mikrotröpfchen stets statt. Beim Verfahren zur quantitativen Erfassung von Ölabbauern ist daher der Einsatz von CCl_4 zur Separation des Öls nur im Zusammenhang mit der Zellzählung sinnvoll.

Das von uns entwickelte Verfahren zur quantitativen Erfassung ölabbauender Mikroorganismen basiert auf dem Wachstumsverhalten von Mischpopulationen unterschiedlicher Ausgangstiter (10^7 N/ml und 10^5 N/ml) in Medien mit Öl als alleiniger Kohlenstoffquelle. Hierbei werden bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase den Kulturen Proben entnommen, mit CCl_4 behandelt, die Keimzahlen mit der Zählkammer bestimmt und Wachstumskurven erstellt. Voraussetzung bei dem Verfahren ist die Annahme, daß ölabbauende Mikroorganismen vorhanden sind und daß das Verhältnis der Ölabbauer zu den Nicht-Ölabbauern in den Ansätzen mit 10^7 N/ml und 10^5 N/ml als Starttiter konstant ist. Da Öl die alleinige C-Quelle ist, können sich lediglich ölabbauende Mikroorganismen vermehren, so daß ihr Anteil an der Gesamtpopulation deutlich wird. Ein Wachstum von nicht-ölabbauenden Mikroorganismen aufgrund von endogenen Speicherstoffen bzw. eventuell übertragenen C-Quellen konnte ausgeschlossen werden (s. Abb. 36a und b). Der Anteil von Mikroorganismen, die das Selektivmedium nicht verwerten können, spiegelt sich in der Anlaufphase (lag-Phase) wider (s. Abb. 37). Weiter wird davon ausgegangen, daß bei einer Animpfkonzentration der Mischpopulation von 10^5 N/ml der Anteil der Nichtölabbauer so gering ist, daß er keinen Einfluß auf die lag-Phase der Wachstumskurve hat. Unter Kenntnis der Adaptationsphase ("wahre" lag-Phase) kann der Anteil ölabbauender Mikroorganismen an der Gesamtpopulation am Inkubationsstart anhand der den Daten der logarithmischen Wachstumsphase angepaßten Regressions-

geraden der Wachstumskurve mit Starttiter 10^7 N/ml errechnet werden:

$$\hat{y} = a + bx,$$

wobei $\hat{y}$ der Schätzer der Zellzahl ölabbauender Mikroorganismen ($\log N/ml$) am Inkubationsstart, a und b die Schätzer der Koeffizienten α und β im Regressionsmodell der logarithmischen Wachstumsphase und x = Dauer der "wahren" lag-Phase bedeuten.

Für Wattmischkulturen konnten die Ölabbauerkeimzahlen bereits nach ca. 7 Tagen Inkubationsdauer ermittelt werden (s. Abb. 38). Dies gelang unter anderem durch die Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 30 °C, verglichen mit 18 °C beim Ölabbauer-MPN-Verfahren (Gunkel & Trekel, 1967). Generell ist eine derartige Temperaturerhöhung sicherlich nicht unkritisch zu sehen. Da Wattmikroorganismen aber starken Temperaturschwankungen ausgesetzt sind, ist keine gravierende selektive Wirkung zu befürchten. Diese Ansicht wurde auch durch Untersuchungen an einem von uns aus dem Watt isolierten, nicht endgültig identifizierten Mikroorganismus bestätigt. Dieses pigmentierte, vermutlich zur Gattung der *Arthrobacter* gehörende Bakterium wurde bei einer Inkubationstemperatur von 18 °C isoliert. Eine zur Bestimmung des Organismus durchgeführte Analyse des Temperaturspektrums ergab ein Wachstumsoptimum bei 30 °C. Bei Temperaturen zwischen 10 °C und 20 °C zeigte sich vergleichsweise geringes Wachstum (Michaelson & Kant, 1986, unveröffentlichte Untersuchungen).

Die von Barford et al. (1982), aber auch von vielen weiteren Autoren beschriebenen Einflüsse auf die Länge von lag-Phasen sind für unseren Fall sicherlich besonders unter dem Aspekt der Anwendung des Verfahrens zu betrachten. Wie zu Beginn erwähnt, sollten Ölabbauerkeimzahlen die Empfehlung von Bekämpfungsmaßnahmen im Falle einer

Ölkontamination unterstützen und somit möglichst rasch zur Verfügung stehen. Einflußfaktoren wie z.B. das Alter einer Animpfkultur oder aber die Umstellung des Enzymsystems auf ein differentes Inkubationsmedium können nicht eliminiert werden. Da die Inokulummenge sich ebenfalls auf die Länge der lag-Phase auswirkt, sollte sie 5 % des anzuimpfenden Mediums nicht unterschreiten (Bailey & Ollis, 1977). Dabei reduziert sich die lag-Phase sowohl mit steigendem Inokulumvolumen (mehr der bereits exkretierten Intermediate werden überimpft) als auch mit steigender inokulierter Zelldichte (fehlende Intermediate können schneller produziert werden). Letzteres ist allerdings durch das hier vorgestellte Verfahren zur quantitativen Erfassung von Keimzahlen ölabbauender Mikroorganismen relativ starr festgelegt.

Die Schwankungsbreite der nach diesem Verfahren ermittelten Ölabbauerkeimzahlen wird hauptsächlich von den folgenden drei Faktoren bestimmt:

- Präzision der die logarithmischen Wachstumsphase beschreibenden Meßwerte, resultierend daraus
- die Präzision der berechneten Adaptationsphase (wahre lag-Phase) und die
- Präzision der Keimzahldaten nach der Behandlung der Kulturproben mit CCl_4 .

Hinsichtlich der Präzision der Ölabbauerkeimzahlen gilt grundsätzlich, daß die CCl_4 -Anwendung geringen Einfluß auf die Zählkammer-Keimzahldaten und die resultierende Standardabweichung der Parallelwerte hat. Bezogen auf das arithmetische Gesamtmittel aus der Zählung von drei Präparaten (mit jeweils neu gefüllter Kammer) zu je 16 gezählten Quadraten ergab sich eine maximale Abweichung ($\gamma = 95 \%$) nach der Behandlung mit CCl_4 von 53 % bis 147 %. Im Durchschnitt liegt der Erwartungswert ($\gamma = 95 \%$) der mit Hilfe der Zählkammer ermittelten Keimzahlen nach CCl_4 zwischen 81 % und 119 %. Dies entspricht der Schwankungsbreite der Keimzahlen vor CCl_4 -Einsatz und kann als all-

gemeingütig für die Zählkammer-Keimzahlen des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Verfahrens angesehen werden. Entsprechend hat der Einsatz von CCl_4 keinen negativen Einfluß auf die Präzision bei der quantitativen Erfassung von Ölabbauerkeimzahlen. Weiterführende Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Anzahlen von Zählungen und Kammerfüllungen unter Berücksichtigung des nötigen Arbeits- und Zeitaufwandes können die Präzision möglicherweise noch optimieren. Ähnliche Kalkulationen führte Oberzill (1967) zur Fehlerbeurteilung bei unmittelbaren Zählverfahren durch.

Dagegen wirken sich die Abweichungen der beobachteten Keimzahldaten von den entsprechend der Regressionsgleichung geschätzten Keimzahlen der exponentiellen Wachstumsphase auf die Präzision der Ölabbauerkeimzahlen aus. Dies gilt zum einen für die Wachstumskurve mit "niedrigem" Animpftiter, wodurch letztendlich die Differenzierung der lag-Phase in "wahre" und "scheinbare" lag-Phase beeinflußt wird. Zum anderen wirken sich die Abweichungen bei Wachstumskurven mit "hohem" Animpftiter auf die Präzision der Meßdaten der logarithmischen Wachstumsphase angepaßten Regressionsgeraden und gekoppelt mit der Präzision der Adaptationsphase ("wahre" lag-Phase) letztendlich auf die Schwankungsbreite der Keimzahlen ölabbauender Mikroorganismen aus. Die geringen relativen Schwankungsbreiten ($\gamma = 95 \%$) der Parameter α (maximal zwischen 94 % und 106 %) und β (maximal zwischen 73 % und 127 %) der Regressionsgeraden der exponentiellen Wachstumsphasen der hier dargestellten Versuchsläufe U (unkontaminiertes Sediment) und K (kontaminiertes Sediment) weisen auf eine hohe Präzision der entsprechend berechneten Ölabbauerkeimzahlen hin. Da die Präzision von der "Wahl" der exponentiellen Wachstumsphase abhängt, ist es notwendig, sie durch möglichst viele Beobachtungswerte zu beschreiben. Beinahe trivial ist es, anzumerken, daß eine geringe Anzahl von Meßwerten bei statistischen Kalkulationen z.B. die Kon-

fidenzintervalle enorm ausdehnt. Die von uns untersuchten exponentiellen Wachstumsphasen wurden jeweils durch fünf Werte (gemittelt aus Auszählungen von jeweils drei Zählkammerpräparaten) festgelegt, was sicherlich als Mindestmaß anzusehen ist.

Hinsichtlich der Präzision der Berechnung der Adaptationszeit bei den Wachstumskurven mit unkontaminiertem Sediment können keine Angaben gemacht werden. Eine statistische Analyse ist nicht möglich, da die zur Berechnung herangezogene logarithmische Wachstumsphase lediglich durch zwei Werte beschrieben wird (s. Abb. 38).

Bei der Analyse der Ölabbauerkeimzahlen, jeweils separat berechnet aus den einzelnen drei Wachstumsversuchen K, zeigte sich die Streuung der Daten, die trotz sorgfältiger Standardisierung zwischen den parallelen Kulturen auftraten. Die einzeln berechneten Startkonzentrationen ölabbauender Mikroorganismen schwankten zwischen 84 % und 113 % bezogen auf das arithmetische Mittel. Die in relative Werte umgerechneten Konfidenzintervallgrenzen ($\gamma = 95 \%$), innerhalb derer sich der wahre Wert befindet, sind, da es sich lediglich um drei Parallelversuche handelt, entsprechend weit gesteckt. Dies weist darauf hin, daß es sinnvoller ist, jeweils eine Wachstumskurve mit ausreichend Meßwerten zu erstellen. Parallele Wachstumskurven bringen zusätzliche Fehlerquellen mit sich.

Für das hier beschriebene Verfahren zur quantitativen Erfassung von Ölabbauern können keine allgemeingültigen Schwankungsbreiten der Ölabbauerkeimzahlen angegeben werden. Solche Angaben sind erst nach statistischer Analyse einer Vielzahl von Wachstumskurven mit definierter Zusammensetzung öl- und nichtölabbauender Mikroorganismen am Inkubationsstart möglich. Bezüglich der Optimierung des Verhältnisses von Arbeitsaufwand und Präzision sollten hierbei wiederum entsprechende Kalkulationen durchgeführt werden.

Vergleicht man nun dieses Verfahren unter Anwendung von Wachstumskurven zur quantitativen Erfassung ölabbauender Mikroorganismen mit der MPN-Methode, so wird deutlich, daß sie verschiedene Bedürfnisse befriedigen und somit auch unterschiedliche Anwendungsbereiche haben. Das MPN-Verfahren hat den Vorteil, daß es mit vergleichsweise wenig Arbeitsaufwand verbunden ist. Die Bestimmung von Lebendkeimzahlen nach dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Verfahren sind dagegen wesentlich aufwendiger. Entsprechendes gilt auch für Bestimmungen durch Epifluoreszenz (Russek & Colwell, 1983). Bei den ölabbauerkeimzahlen, die unter Verwendung des MPN-Verfahrens ermittelt werden, handelt es sich allerdings um Daten mit großer Schwankungsbreite. Das von Russek & Colwell (1983) vorgestellte Computerprogramm zum MPN-Verfahren für die Berechnung von Keimzahlen bietet bereits eine höhere Zuverlässigkeit. Für Untersuchungen, bei denen geringe Differenzen von Keimzahlen signifikant sind, liefert das MPN-Verfahren keine ausreichend präzisen Daten. Auch ist die Methode nicht dazu geeignet, ölabbauerkeimzahlen schnell zur Verfügung zu stellen. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Verfahren zur quantitativen Erfassung ölabbauender Mikroorganismen ist dagegen in der Lage, bereits nach ca. 7 Tagen Keimzahlen geringer Schwankungsbreite zu liefern. Allerdings können lediglich Sedimente mit Mikroorganismenkonzentrationen ab 10^7 N/g Feuchtsediment eingesetzt werden. Es handelt sich aber um eine Erweiterung der Methodik der Keimzahlbestimmung ölabbauender Mikroorganismen. Bei routinemäßigen Bestimmungen, insbesondere mit großen Probezahlen, kann es das dafür hervorragend geeignete MPN-Verfahren nicht ersetzen.

5. Zusammenfassung

Ausgehend vom Szenario einer großflächigen, dünn-schichtigen Verölung von Wattflächen nach einem Tanker-unfall in der deutschen Bucht kann das Öl letztendlich nur durch mikrobiellen Abbau entfernt werden. Der Anteil öl-abbauender Mikroorganismen an der Gesamtpopulation wird dabei u.a. zur Beurteilung des Ölabbaupotentials eines Ökosystems herangezogen. Die vorliegende Arbeit liefert einen Beitrag zur Entwicklung von Bekämpfungsstrategien bei Ölkontaminationen in Wattsedimenten. Dazu wurden die Möglichkeiten der Förderung des mikrobiellen Ölabbaus anhand von Freiland- (Vareler Watt, Jadebusen) und Labor-untersuchungen geprüft. Meßparameter waren Lebendkeim-zahlen (TCFU) und Kohlenwasserstoffabbauraten. Für die quantitative Bestimmung von ölabbauenden Mikroorganismen in Wattsedimenten wurde ein Verfahren entwickelt, das es gestattet, Ölabbauerkeimzahlen möglichst rasch und mit höherer Präzision, verglichen mit bisher gängigen Ver-fahren, zu erfassen.

Die Ergebnisse der Freiland- und Laboruntersuchungen können wie folgt zusammengefaßt werden:

- Eine dünn-schichtige Ölkontamination hat keine re-duzierende Wirkung auf die Lebendkeimzahlen der Sediment-oberfläche.
- Eine Düngung der ölkontaminierten Schlickwattflächen mit Stickstoff und Phosphat kann den mikrobiellen Ölabbau nicht fördern, da die Sauerstoffversorgung des Sediments der Parameter ist, der den Abbau limitiert. Bei aeroben Sedimenten führt eine solche Düngung dagegen zu erhöhten Kohlenwasserstoffabbauraten.
- Die mikrobielle Kohlenwasserstoff-Abbauleistung ist mit $36 \text{ kg/m}^3/\text{Jahr}$ im Schlickwatt unter aeroben Bedingungen enorm hoch.

- Durch Animpfen mit öloxidierenden Mikroorganismen kann der mikrobielle Ölabbau nicht beschleunigt werden.
- Der Kohlenwasserstoffabbau wird durch den Einsatz der Dispergatoren Corexit 9527, Metryl OD bzw. THL nicht gefordert. THL verhindert aber aufgrund seiner Imprägniereigenschaft das Eindringen des Öls in das Sediment.

Für das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Verfahren zur quantitativen Erfassung ölabbauender Mikroorganismen in Sedimenten sind folgende grundsätzliche Bedingungen erfüllt:

- Optimale Abtrennung der Mikroorganismen vom Sediment sowie Zerteilung der Mikroorganismenaggregate durch den Einsatz von 0,5 % (v/v) TWEEN 80.
- Gewährleistung des für die Vermehrung von ölabbauenden Mikroorganismen notwendigen Kontakts zum Substrat Öl durch die Verwendung von Flüssigmedien.
- Reduzierung des Einflusses insbesondere von emulgierten Ölen bei der Erfassung von ölabbauerkeimzahlen durch die Separation des Öls aus dem wässrigen mikroorganismenhaltigen Medium mit 10 % (v/v) Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4).

Das hier entwickelte Verfahren zur quantitativen Erfassung ölabbauender Mikroorganismen basiert auf dem Wachstumsverhalten von Watzmischpopulationen in Medien mit Öl als alleiniger C-Quelle. Der Anteil von Mikroorganismen, die das Selektivmedium nicht verwerten können, beeinflusst die Länge der Anlaufphase (lag-Phase) der Wachstumskurven mit relativ hohem Animpftiter (10^7 N/ml) deutlich. Bei geringem Animpftiter (10^5 N/ml) kann davon ausgegangen werden, daß der Anteil der Nichtölabbauer soweit reduziert ist, daß er keinen Einfluß auf die lag-Phase hat und so die Adaptationsphase ("wahre" lag-Phase) identifizierbar ist. Unter Kenntnis dieser "wahren" lag-Phase kann der Anteil ölabbauender Mikroorganismen an der Gesamtpopula-

tion anhand der den Meßwerten der logarithmischen Wachstumsphase angepaßten Regressionsgeraden mit hohem Starttiter errechnet werden. Ein Einfluß des Verlaufs der Wachstumskurven durch Vermehrung von nicht-ölabbauenden Mikroorganismen ist nicht vorhanden. Die Keimzahlen zur Erstellung der Wachstumskurven werden nach Separation des Öls durch CCl_4 durch Auszählen in der Zählkammer ermittelt. Die statistische Überprüfung der Keimzahldaten ergab, daß nach der Behandlung mit CCl_4 der Erwartungswert bei 95 % statistischer Sicherheit durchschnittlich zwischen 81 % und 119 % liegt. Dies entspricht der Schwankungsbreite der Keimzahlen vor CCl_4 -Behandlung. Die geringen relativen Schwankungsbreiten der Koeffizienten im Regressionsmodell der exponentiellen Wachstumsphasen der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Wachstumskurven weisen auf eine hohe Präzision der entsprechend ermittelten Ölabbauerkeimzahlen hin: α max. zwischen 94 % und 106 %, β max. zwischen 73 % und 127 %. Anhand dieses Bestimmungsverfahrens konnten Ölabbauerkeimzahlen bereits nach ca. 7 Tagen Inkubationsdauer ermittelt werden. Dies wurde u.a. durch eine Inkubationstemperatur von 30 °C erreicht. Kritisch anzumerken ist, daß das vorgestellte Verfahren zur quantitativen Erfassung ölabbauender Mikroorganismen hohe Keimkonzentrationen (ca. 10^7 N/g Feuchtsediment) und relativ große Mengen Untersuchungsmaterial erfordert.

6. Anhang

6.1. Verwendete Bezeichnungen der angewandten Statistik

x_i	N/ml-Meßwerte
y_i	ΔE_{550} -Meßwerte
X	Zufallsvariable optische Dichte [ΔE_{550}]
Y	Zufallsvariable Mikroorganismenkonzentration [N/ml]
$\bar{x}$ bzw. $\bar{y}$	arithmetisches Mittel der x_i - bzw. y_i -Werte
$\hat{x}$ bzw. $\hat{y}$	Schätzer im Regressionsmodell für X bzw. Y
$\hat{x}_i$ bzw. $\hat{y}_i$	Schätzer für x_i bzw. y_i
μ_x bzw. μ_y	Erwartungswert der Zufallsvariablen X bzw. Y
X_v bzw. Y_v	Zufallsvariable X bzw. Y vor CCl_4 -Behandlung
X_N bzw. Y_N	Zufallsvariable X bzw. Y nach CCl_4 -Behandlung
μ_{xv} bzw. μ_{xN}	Erwartungswert der Zufallsvariablen X_v vor bzw. X_N nach der Behandlung mit CCl_4
μ_{yv} bzw. μ_{yN}	Erwartungswert der Zufallsvariablen Y_v vor bzw. Y_N nach der Behandlung mit CCl_4
s	Schätzer für die Standardabweichung
s^2	Schätzer für die Varianz
σ^2	Varianz
s_x bzw. s_y	Schätzer für die Standardabweichung der Zufallsvariablen X bzw. Y bei Parallel- messungen
s^*	Zusammenfassung - Schätzer für die Standardabweichung bei Versuchsreihen
s^{*2}	Zusammenfassung - Schätzer für die Varianz bei Versuchsreihen
$s^{*,v}$ bzw. $s^{*,N}$	Zusammenfassung - Schätzer für die Standardabweichung bei Versuchsreihen vor bzw. nach CCl_4 -Behandlung
$s^{*_{xv}}$ bzw. $s^{*_{xN}}$	Zusammenfassung - Schätzer für die Standardabweichung der Zufallsvariablen X bei Versuchsreihen vor bzw. nach CCl_4 -Behandlung

s_{xy}^* bzw. s_{yx}^*	Zusammenfassung - Schätzer für die Standardabweichung der Zufallsvariablen Y bei Versuchsreihen vor bzw. nach CCl ₄ -Behandlung
$s_{y,x}$	Standardfehler des Schätzers $\hat{y}$
t	t-verteilte Zufallsvariable
t	Schätzwert für t-verteilte Zufallsvariable
	Konfidenzzahl
r	Korrelationskoeffizient
α und β	Koeffizienten im Regressionsmodell $y=\alpha+\beta x+\epsilon$
β_v bzw. β_N	Koeffizienten im Regressionsmodell für Y_v bzw. Y_N
b_v bzw. b_N	Schätzer für β_v bzw. β_N
ϵ	Zufallsfehler
$V(\epsilon)$	Varianz des Fehlers
$E(\epsilon)$	Erwartungswert des Fehlers
H_0	Nullhypothese
H_A	Alternativhypothese
d_1	Differenz der OD-Meßwerte
μ_d	Erwartungswert der Zufallsvariablen Differenz der OD-Meßwerte
n	Stichprobenumfang
FG	Freiheitsgrad
Σ	Summenzeichen

7. Literaturverzeichnis

AHEARN, D.G. & S.P. MEYERS, 1973. The microbial degradation of oil pollutants. - Workshop held at Georgia State University, Atlanta, Dec. 1972, Center for Wetland Resources, Publ. No. LSU-SG-73-01.

ALEXANDER, M., 1965. Most-Probable-Number Method for microbial populations. In: C.A. BLACK. Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties No. 9. Am. Society of Agronomy, Inc., Publishers, Madison, Wisconsin, USA.

ATLAS, R.M. & R. BARTHA, 1972. Degradation and mineralization of petroleum in sea water: limitation by nitrogen and phosphorus. - Biotechnol. Bioengineer. 14:309-318.

ATLAS, R.M. & R. BARTHA, 1973. Effects of some commercial oil herders, dispersants and bacterial inocula on biodegradation of oil in seawater. In: D.C. AHEARN & S.P. MEYERS. The Microbial Degradation of Oil Pollution. Publ. No. LSU-73-01, Louisiana State University, Center for Wetland Resources, Baton Rouge:283-288.

ATLAS, R.M., 1977. Stimulated petroleum biodegradation. - Crit. Rev. Microbiol. 5:371-386.

ATLAS, R.M., 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. - Microbial. Rev. 45:180-209.

BAILEY, J.E. & D.F. OLLIS, 1977. Biochemical Engineering Fundamentals. Mc Graw- Hill Kogakusha.

BARFORD, J.P., N.B. PAMMENT & R.J.HALL, 1982. Lag phases and transients. In: M.J.BAZIN. Microbial Population Dynamics:55-89.

BARTHA, R. & R.M. ATLAS, 1977. The microbiology of aquatic oilspills. - Appl. Microbiol. 22:225-265.

BECK, Th., 1968. Mikrobiologie des Bodens. Bayr. Landw.-Verlag, München, Basel, Wien.

BERNEM, K.H. van, 1984. Experimentelle Untersuchungen zur Wirkung von Rohöl und Rohöl-Tensidgemischen im Ökosystem Wattenmeer. II. Eindringverhalten und Persistenz von Roh-Ölkohlenwasserstoffen in Sedimenten nach experimenteller Kontamination. - Senckenbergiana marit. 16:13-30.

BREUEL, A., 1981. Oil spill cleanup and protection techniques for shorelines and marshlands. - Noyes Data Corp. Park Ridge, New Jersey.

BUCK, J.D. & R.C. CLEVERDON, 1961. The effect of TWEEN 80 on the enumeration of marine bacteria by the spread and pour plate methods. - *Limnol. Oceanogr.* 6:42-44.

CHET, J. & R. MITCHELL, 1976. Ecological aspects of microbial chemotactic behavior. - *Ann. Rev. Microbiol.* 30:221-239.

CHOUTEAU, J., E. AZOULAY & J.C. SENEZ, 1962. Anaerobic formation of n-hept-1-ene from n-heptane by resting cells of *Pseudomonas aeruginosa*. - *Nature, London*, 194:576-578.

COCHRAN, W.G., 1950. Estimation of bacterial densities by means of the "Most Probable Number". - *Biometrics* 6 (2): 105-116.

COLWELL, R.R., 1977. Microbial ecology of oil spills occurring in the marine environment. - VI. Congress Nacional De Microbiologia Departamento De Microbiologia Universidad De Santiago De Compostela (Espana). 6.-9. Juli 1977.

DEAN, A.C.R. & Sir C. HINSHELWOOD, 1966. Growth, Funktion and Regulation in Bacterial Cells. At the Clarendon Press, Oxford.

DIBBLE, J.T. & R. BARTHA, 1979. Effect of environmental parameters on biodegradation of oil sludge. - *Appl. Environ. Microbiol.* 37:729-739.

DÖRJES, J., 1984. Experimentelle Untersuchungen zur Wirkung von Rohöl und Rohöl/Tensidgemischen im Ökosystem Wattenmeer. I. Einführung und abiotische Parameter. - *Senckenbergiana marit.* 16:1-11.

FARKE, H., 1984. Oil spill dispersants: five years of research. - *Erdöl und Kohle* 37:50-52.

FLOODGATE, G.D., 1984. The fate of petroleum in marine ecosystems. In: R.M. ATLAS. *Petroleum Microbiology*. Macmillan, New York:355-397.

FOGHT, J.M. & D.W.S. WESTLAKE, 1982. Effect of the dispersant Corexit 9527 on the microbial degradation of Prudhoe Bay oil. - *Can. J. Microbiol.* 38:117-122.

GASSMANN, G. & W. GUNKEL, 1983. Long-term investigations on chemical and microbial changes of a slightly oil polluted beach. In: *Proceedings of the 1979 Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington D.C.: 479-483.

GERLACH, S.A., 1976. Ölverschmutzung. - Manuskript für die 2. engl. Auflage, Meeresverschmutzung, Springer Verlag, Heidelberg.

- GIBBS, C.F., 1975. Quantitative studies on marine biodegradation of oil. I. Nutrient limitation at 14 °C. - Proc. Roy. Soc., London 188:61-82.
- GIBBS, C.F. & S.J. DAVIS, 1976. The rate of microbial degradation of oil in a beach gravel column. - Microbiol. Ecol. 3:55-64.
- GIBBS, C.F., K.B. PUGH & A.R. ANDREWS, 1975. Quantitative studies on marine biodegradation of oil. II. Effects of temperature. - Proc. Roy. Soc., London 188:83-94.
- GOLOMBEK, P. & L. NEUGEBOHRN, 1985. Deichsvorländer. In: Th. HÖPNER, K.H. van BERNEM, P. GOLOMBEK, U. KANT, K. KIESEWETTER, M. MICHAELSEN, L. NEUGEBOHRN, G. RAMM, R. SUDA & K. WONNEBERGER. Untersuchungen mit dem Ziel des Vorschlags biologischer Maßnahmen bei Ölverschmutzungen der Wattoberfläche und des Deichsvorlandes. Abschlußbericht des Vorhabens 01 ZV 131 an die DFVLR. Univers. Oldenburg: Teil 10.
- GRIFFITH, R.P., T.M. Mc NAMARA, B.A. CALDWELL & R.Y. MORITA, 1981. A field study on the acute effects of the dispersant Corexit 9527 on glucose uptake by marine microorganisms. - Mar. Environm. Res. 5 (2):83-92.
- GUNDLACH, E.R., P.D. BOEHM, M. MARCHAND, R.M. ATLAS, D.M. WARD & D.A. WOLFE, 1983. The fate of Amoco Cadiz oil. - Science 221:122-129.
- GUNKEL, W., 1964. Die Verwendung des Ultra-Turrax zur Aufteilung von Bakterienaggregaten in marinen Proben. - Helg. Wiss. Meeresunters. 11 (3-4):287-295.
- GUNKEL, W., 1967. Experimentell-ökologische Untersuchungen über die limitierenden Faktoren des mikrobiellen Ölabbau im marinen Milieu. - Helg. Wiss. Meeresunters. 15:210-225.
- GUNKEL, W., 1968a. Bacteriological investigations of oil-polluted sediments from the Cornish Coast following the Torrey Canyon disaster. - The Biological Effects of Oil Pollution on Littoral Communities, Supplement to Field Studies, 2:151-158.
- GUNKEL, W., 1968b. Die Fluktuation der Bakterien im jahreszeitlichen Verlauf der Nordsee. - Veröff. Inst. Meeresf. Bremerh. Sonderband 3:121-124.
- GUNKEL, W., 1972. Unser verschmutzter Planet. In: H. SCHULTZE. Umweltreport. Umschau Verlag Breidenstein KG, Frankfurt a. Main:160-161.

GUNKEL, W., 1974. Toxicity testing at the Biologische Anstalt Helgoland, West Germany. In: L.R. BEYNON & E.B. COWELL. Ecological aspects of toxicity testing oils and dispersants. Appl. Science Publ. LTD, Barking, Essex, England:75-85.

GUNKEL, W., 1984. Kann Impfen mit Bakterien den Ölabbau im Meer beschleunigen? - Wissenschaftsmagazin 7, Biotechnologie:112-115.

GUNKEL, W., 1987. Wie beeinflussen Dispergatoren den Ölabbau im Meer? In: M. WUNDERLICH. Chemische Verfahren zur Bekämpfung von Verschmutzungen der Deutschen Küste und der See durch Öl. Forschungsbericht 102 04 216/05 an das UBA: 316-322.

GUNKEL, W. & W. MINAS, 1985. Ölabbau im Meer. AG Ölunfälle, Tagung Loccum, 18.-20. Sept. 1985:2-14.

GUNKEL, W. & C.H. OPPENHEIMER, 1963. Experiments regarding the sulfide formation in sediments of the Texas Gulf Coast. In: C.H. OPPENHEIMER & C.C. THOMAS. Symposium on Marine Microbiology, Springfield:674-684.

GUNKEL, W. & G. RHEINHEIMER, 1968. Bakterien. In: C. SCHLIEPER. Methoden der meeresbiologischen Forschung. Fischer Verlag, Jena:142-157.

GUNKEL, W. & H.H. TREKEL, 1967. Zur Methodik der quantitativen Erfassung ölabbauender Bakterien in verölten Sedimenten und Böden, Öl-Wassergemischen, ölen und teerartigen Substanzen. - Helg. Wiss. Meeresunters. 16:336-348.

GUSEV, M.V. & T.V. KORONELLI, 1982. Microbial degradation of petroleum contaminants. - Biology Bulletin of the Academy of Science of the USSR 8:478-486.

HALVORSON, H.O. & N.R. ZIEGLER, 1933a. Application of statistics to problems in bacteriology. I. A means of determining bacterial population by the dilution method. - Jour. Bact. 25 (2):101-121.

HALVORSON, H.O. & N.R. ZIEGLER, 1933b. Application of statistics to problems in bacteriology. III. A consideration of the accuracy of dilution data obtained by using several dilutions. - Jour. Bact. 26 (6):559-567.

HARTUNG, J., B. ELPELT & K.-H. KLÖSENER, 1982. Statistik. Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik. Oldenbourg-Verlag, München, Wien.

HEYER, J., 1966. Beobachtungen über das Wachstum von Bakterien in nichtwässrigen Medien. In: J.MALEK & W. SCHWARTZ. Vorträge des internationalen Symposiums "Erdölmikrobiologie", Brno (CSSR) 5.-7.10.1964, Akad. Verlag, Berlin:227-229.

HIGASHIHARA, T., A. SATO & U. SIMIDU, 1978. An MPN method for the enumeration of the marine hydrocarbon degrading bacteria. - Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 44:1127-1134.

HOBBIE, J.E., R.J. DALEY & S. JASPER, 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by Fluorescence Microscopy. - Appl. Environ. Microbiol. 33 (5):1225-1228.

HÖPNER, Th. und MITARBEITER, 1987. Untersuchungen mit dem Ziel des Vorschlags biologischer Maßnahmen bei Ölverschmutzungen der Wattoberfläche. - Forschungsbericht des Vorhabens 01 ZV 85070 an das BMFT. Univers. Oldenburg.

HÖPNER, Th., K.H. van BERNEM, W. BRÜGGEMANN, P. GOLOBEK, U. KANT, K. KIESEWETTER, M. MICHAELSEN, L. NEUGEBOHRN, G. RAMM, R. SUDA & K. WONNEBERGER, 1985a. Untersuchungen mit dem Ziel des Vorschlags biologischer Maßnahmen bei Ölverschmutzungen der Wattoberfläche und des Deichsvorlandes. Abschlußbericht des Vorhabens 01 ZV 131 an die DFVLR. Univers. Oldenburg.

HÖPNER, Th., B. KÜRZEL, C. ORLICZEK & K. WONNEBERGER, 1985b. Verhalten, Abbau und Elimination von Öl in oberflächennahen Sedimentschichten. In: Th. HÖPNER, K.H. van BERNEM, W. BRÜGGEMANN, P. GOLOBEK, U. KANT, K. KIESEWETTER, M. MICHAELSEN, L. NEUGEBORN, G. RAMM, R. SUDA & K. WONNEBERGER, 1985. Untersuchungen mit dem Ziel des Vorschlags biologischer Maßnahmen bei Ölverschmutzungen der Wattoberfläche und des Deichsvorlandes. Abschlußbericht des Vorhabens 01 ZV 131 an die DFVLR. Univers. Oldenburg:Teil 4.

HÖPNER, Th., W. BRÜGGEMANN, U. DALYAN, H. HADER, M. KANJE, U. KANT, K. KIESEWETTER, B. KOOPMANN, B. KÜRZEL, M. MICHAELSEN, C. ORLICZEK, R. WEINERT, I. WOLKE & K. WONNEBERGER, 1987. Kohlenwasserstoffabbau im Wattsediment als biologischer Prozess und als Entscheidungskriterium bei der Ölunfall-Bekämpfung. In: M. WUNDERLICH. Chemische Verfahren zur Bekämpfung von Verschmutzungen der deutschen Küste und der See durch Öl. Forschungsbericht 102 04 216/05 im Auftrag des UBA:329-347.

HOROWITZ, A., D. GUTNICK & E. ROSENBERG, 1975. Sequential growth of bacteria on crude oil. - Appl. Microbiol. 30 (1):10-19.

IL'INSKII, V.V., M.V. GUSEV & T.V. KORONELLI, 1978. Hydrocarbon-oxidizing microflora in unpolluted seawater. - Mikrobiologiya 48:346-350.

JOHNSTON, R., 1970. The decomposition of crude oil residues in sand columns. - J. Mar. Biol. Ass., U. K. 50:925-937.

JONES, G.E. & H.W. JANNASCH, 1959. Aggregates of bacteria in sea water as determined by treatment with surface active agents. - *Limnol. Oceanogr.* 4:269-276.

JORDAN, R. E. & J. R. PAYNE, 1980. Fate and weathering of petroleum spills in the marine environment. - *Ann Arbor Science, Ann Arbor.*

KANT, U. & M. MICHAELSEN, 1985. Entwicklung der Keimzahlen bei artifizieller Ölkontamination der Wattoberfläche und Verfahren zur Keimzahlbestimmung. In: Th. HÖPNER, K.H. van BERNEM, W. BRÜGGEMANN, P. GOLOMBEK, U. KANT, K. KIESEWETTER, M. MICHAELSEN, L. NEUGEBOHRN, G. RAMM, R. SUDA & K. WONNEBERGER. Untersuchungen mit dem Ziel des Vorschlags biologischer Maßnahmen bei Ölverschmutzungen der Wattoberfläche und des Deichsvorlandes. Abschlußbericht des Vorhabens 01 ZV 131 an die DFVLR. Univers. Oldenburg:Teil 10.

KANT, U., K. KIESEWETTER, M. MICHAELSEN & Th. HÖPNER, 1985. Estimation of hydrocarbon biodegradation velocities in tidal sediments under standard conditions. Final Report to the Commission of European Communities. Univers. Oldenburg.

KOHLRAUSCH, F., 1968. *Praktische Physik*, Band 1. Teubner-Verlag, Stuttgart:186-188.

KREYSZIG, E., 1977. *Statistische Methoden und ihre Anwendung*. Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen.

KRUMBEIN, W.E., P. FRANKE, K. JENS & R. WEINERT, 1980. Bericht über die im Hauptversuch durchgeführten mikrobiologischen Feld- und Laboruntersuchungen. In: Jahresbericht des Forschungsvorhaben Wasser 10208018, Lebensraum Küstenbereich, Experimentelle Untersuchungen zur Auswirkung von Ölundfällen vor der Deutschen Küste auf das Ökosystem Wattenmeer an das UBA. Univers. Oldenburg.

KRUMBEIN, W.E., P. FRANKE & K. JENS, 1984. Experimentelle Untersuchungen zur Wirkung von Rohöl und Rohöl/Tensid-Gemischen im Ökosystem Wattenmeer. III. Entwicklung der benthischen Mikrofauna. - *Senckenbergiana marit.* 16:31-55.

LANG, S. & F. WAGNER, 1985. Charakterisierung, Bildung und Funktion von mikrobiellen Tensiden. - AG Ölundfälle, Tagung Loccum, Sept. 1985:1-6.

LEVRING, T., 1946. Some culture experiments with *Ulva* and artificial seawater. - *Kungl. Fysiografiska Sällskapets i Lund Forhandlingar* 16 (7):45-56.

LINDEN, A.C. van der, 1978. Degradation of oil in the marine environment. In: R.J. WATKINSON. Developments in biodegradation of hydrocarbons/1. Appl. Science Publ., London:165-200.

MARTIN, H.J. & U. WALTER, 1984. Umweltthema Nordsee. Bürgerinitiative Umweltschutz Wilhelmshaven. Zeitdruck, Schortens.

MICHAELSEN, M. & U. KANT, 1986. Unveröffentlichte Ergebnisse.

MILLS, A.L., C. BREUIL & R.R. COLWELL, 1978. Enumeration of petroleum-degrading marine and estuarine microorganisms by the Most-Probable-Number method. - Can. J. Microbiol. 24:552-557.

MULKIN-PHILLIPS, G.J. & J.E. STEWART, 1974. Distribution of hydrocarbon-utilizing bacteria in Northwestern Atlantic waters and coastal sediments. - Can. J. Microbiol. 20:955-962.

Niedersächsischer Arbeitsausschuß "Ölschlammabeseitigung" (Gräbe, H. et al.), 1980. Arbeitspapier "Beseitigung von Ölschlämmen aus Tankerunfällen an der Küste". Oldenburg.

OBERZILL, W., 1967. Mikrobiologische Analytik. Verlag Hans Carl, Nürnberg.

PERRY, J.J., 1984. Microbial metabolism of cyclic alkanes. In: R.M. ATLAS. Petroleum Microbiology. Macmillan, New York:60-97.

PETTIPHER, G.L. & U.M. RODRIGUES, 1982. Semi-automated counting of bacteria and somatic cells in milk using epifluorescence microscopy and television image analysis. - J. Appl. Bacteriol. 53:323-329.

PETTIPHER, G.L., R.J. FULFORD & L.A. MABBITT, 1983. Collaborative trial of the direct epifluorescence filter technique (DEFT), a rapid method for counting bacteria in milk. - J. Appl. Bacteriol. 54:177-182

PFAENDER, F.K. & E.N. BUCKLEY III, 1984. Effects of petroleum on microbial communities. In: R.M. ATLAS. Petroleum Microbiology. Macmillan, New York:507-536.

RAGUTZKI, G., 1983. Verteilung und Eigenschaften der Wattsedimente des Jadebusens. - Forschungsstelle für Insel- und Küstenschutz. Band 34, Norderney.

RAMM, G., 1985. Verhalten des Mikrophytobenthos bei artifizuellen Ölkontaminationen der Wattoberfläche. In: Th. HÖPNER, K.H. van BERNEM, W. BRÜGGEMANN, P. GOLOMBEK, U. KANT, K. KIESEWETTER, M. MICHAELSEN, L. NEUGEBOHRN, G. RAMM, R. SUDA & K. WONNEBERGER. Untersuchungen mit dem Ziel des Vorschlags biologischer Maßnahmen bei Ölverschmutzungen der Wattoberfläche und des Deichsvorlandes. Abschlußbericht des Vorhabens 01 ZV 131 an die DFVLR. Univers. Oldenburg:Teil 10.

RATLEDGE, C., 1978. Degradation of aliphatic hydrocarbons. In: R.J. WATKINSON. Developments in Biodegradation of Hydrocarbons - 1. Appl. Science Publ., London:1-46.

RUSSEK, E. & R.R. COLWELL, 1983. Computation of Most Probable Numbers. - Appl. Environ. Microbiol. 45:1646-1650.

SACHS, L., 1984: Angewandte Statistik. Springer-Verlag, Berlin.

SCHLEGEL, H.G., 1981. Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

SHAPIRO, S.S. & M.B. WILK, 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). - Biometrika 52 (3 und 4):591-606.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTE-WATER, 1985. A.E. GREENBERG (ed.). Am. Publ. Health Association, 16.ed., Washington D.C.

TAGGER, S., A. BIANCHI, M. JULLIARD, J. LE PETIT & B. ROUX, 1983. Effect of microbial seeding of crude oil in seawater in a model system. Mar. Biol. 78:13-20.

TAIT, R.V., 1971. Meeresökologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

TEH, J.S., 1974. Toxicity of short-chain fatty acids and alcohols toward *Cladosporium resinae*. - Appl. Microbiol. 28:840-844.

TEH, J.S. & K.H. LEE, 1974. Effects of n-alkanes on *Cladosporium resinae*. - Can. J. Microbiol. 20:971-976.

TRAXLER, R.W. & J.M. BERNARD, 1969. The utilisation of n-alkanes by *Pseudomonas aeruginosa* under conditions of anaerobiosis. - Int. Biodeterior. Bull. 5:21-25.

WAGNER, F., 1984. Chemische Verfahren zur Bekämpfung von Meeresverschmutzungen bei Ölunfällen. - Tischvorlage zur Sitzung der Arbeitsgruppe zur meereskundlichen Untersuchung von Ölunfällen, 5.9.84 in Oldenburg:1-4.

WALKER, J.D. & R.R. COLWELL, 1975. Some effects of petroleum on estuarine and marine microorganisms. - Can J. Microbiol. 21:305-313.

WALKER, J.D. & R.R. COLWELL, 1976. Enumeration of petroleum-degrading microorganisms. - Appl. Environ. Microbiol. 31:198-207.

WALKER, J. D. & R. R. COLWELL, 1977. Role of autochthonous bacteria in the removal of spilled oil from sediment. - Environ. Pollut. 12:51-56.

WALKER, J. D., R. R. COLWELL & L. PETRAKIS, 1975. Biodegradation of petroleum by Chesapeake Bay sediment bacteria. - Can. J. Microbiol. 22 (3):423-428.

WARD, D., R.M. ATLAS, P.D. BOEHM & J.A. CALDER, 1980. Microbial biodegradation and the chemical evolution of Amoco Cadiz oil pollutants. - Ambio 9:277-283.

WELLS, P.G., 1984. The toxicity of oil spill dispersants to marine organisms: A current perspective. In: T.E. ALLAN. Oil Spill Chemical Dispersants. ASTM, Philadelphia:177-202.

WONNEBERGER, K., 1985. Freilandexperimente zur Nährstoff-Versorgung der Wattoberfläche und des biologischen Kohlenwasserstoffabbaus. In: Th. HÖPNER, K.H. van Bernem, P. GOLOBEK, U. KANT, K. KIESEWETTER, M. MICHAELSEN, L. NEUGEBOHRN, G. RAMM, R. SUDA & K. WONNEBERGER. Untersuchungen mit dem Ziel des Vorschlags biologischer Maßnahmen bei Ölverschmutzungen der Wattoberfläche und des Deichsvorlandes. Abschlußbericht des Vorhabens 01 ZV 131 an die DFVLR. Univers. Oldenburg:Teil 5.

ZEECK, E., 1980. Determination and localization of oil components in living benthic organisms by Fluorescence Microscopy. - Helv. Wiss. Meeresunters. 33:272-277.

ZOBELL, C.E., 1949. Rate at which oil is oxidized by bacteria. - Environment Monitors, P.O. Box 3028, Fort Worth, Texas, June 1949.

ZOBELL, C.E., 1964. The occurrence, effects and fate of oil polluting the sea. - Reprinted from International Conference on Water Pollution Research, London, Sept. 1962. Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris:85-118.

ZOBELL, C.E., 1969. Microbial modification of crude oil in the sea. - Proc. API/FWPCA Conference on Prevention and Control of Oil Spills, API Publ. 4040:317-326.

ZOBELL, C.E., 1973. Microbial degradation of oil: Present status, problems and perspectives. - Center for Wetland Resources, Publ. No. LSU-SG-73-01:3-17.

8. Schriftenverzeichnis

KANT, U. & M. MICHAELSEN, 1985. Entwicklung der Keimzahlen bei artifizieller Ölkontamination der Wattoberfläche und Verfahren zur Keimzahlbestimmung. In: Th. HÖPNER, K.H. van BERNEM, W. BRÜGGEMANN, P. GOLOBEK, U. KANT, K. KIESEWETTER, M. MICHAELSEN, L. NEUGEBOHRN, G. RAMM, R. SUDA & K. WONNEBERGER. Untersuchungen mit dem Ziel des Vorschlags biologischer Maßnahmen bei Ölverschmutzungen der Wattoberfläche und des Deichsvorlandes. Abschlußbericht des Vorhabens 01 ZV 131 an die DFVLR, Universität Oldenburg: Teil 10.

KANT, U., K. KIESEWETTER, M. MICHAELSEN & Th. HÖPNER, 1985. Estimation of hydrocarbon biodegradation velocities in tidal sediments under standard conditions. Final Report to the Commission of European Communities, Universität Oldenburg.

KANT, U., K. KIESEWETTER, M. MICHAELSEN & Th. HÖPNER, 1986. Estimation of hydrocarbon biodegradation velocities in tidal sediments under standard conditions. In: Proceedings of Workshop on Combatting Sea Oil Pollution. EEC Pilot Projects, Brüssel, 1.-3. July 1986.

HÖPNER, Th., U. KANT, K. KIESEWETTER, M. MICHAELSEN & B. TEGELKAMP, 1986. Hydrocarbon biodegradation in aerobic marine sediments. - Baltic Sea Environment Proceedings 22, Seminar on Oil Pollution Questions, 19.-20. November 1986, Norrköping (Schweden): 54-67.

HÖPNER, Th., W. BRÜGGEMANN, U. DALYAN, H. HARDER, M. KANJE, U. KANT, K. KIESEWETTER, B. KOOPMANN, B. KÜRZEL, M. MICHAELSEN, C. ORLICZEK, R. WEINERT, I. WOLKE & K. WONNEBERGER, 1987. Kohlenwasserstoffabbau im Wattsediment als biologischer Prozess und als Entscheidungskriterium bei der Ölunfallbekämpfung. In: M. WUNDERLICH. Chemische Verfahren zur Bekämpfung von Verschmutzungen der deutschen Küste und der See durch Öl. Forschungsbericht 10204 216/05 im Auftrag des UBA: 329-347.

MICHAELSEN, M. & U. KANT, 1987. Keimzahlbestimmung ölabbauender Bakterien. In: Th. HÖPNER und MITARBEITER. Bekämpfung der Meeresverschmutzungen mit dem Ziel des Vorschlags biologischer Maßnahmen bei Ölverschmutzungen der Wattoberfläche. Forschungsbericht Umweltforschung und Umwelttechnologie an das BMFT, Universität Oldenburg: 68-78.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand an der Universität Oldenburg unter der Anleitung von Dr. L. Berthe-Corti und Prof. Dr. Th. Höpner. Wir danken ihnen ganz besonders für die wissenschaftliche Unterstützung und anregenden Diskussionen. Unser besonderer Dank gilt auch Dr. H.P. Bäumer, der durch seine wertvollen Ratschläge bezüglich der angewandten Statistik sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Dank gilt auch Dipl.Biol. K. Kieseewetter für die Überlassung von wissenschaftlichen Daten sowie Dr. W. Gunkel für die hilfreiche Einführung in die Thematik des mikrobiellen Ölabbaus anlässlich unseres Aufenthaltes an der Biologischen Anstalt Helgoland.

Weiter danken wir Frau B. Brunies und Frau B. Kürzel für die hilfreiche Mitarbeit bei Versuchsdurchführungen sowie Frau S. Seufer für die Erstellung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Nicht zuletzt gilt besonderer Dank unseren Eltern, die uns das Studium und somit die Basis für diese Arbeit ermöglicht haben.

Diese Arbeit wurde teilweise finanziell unterstützt vom Bundesministerium für Forschung und Technologie (Projektträger: Deutsche Forschungs- und Versuchsanstalt für Luft- und Raumfahrt) sowie von der Europäischen Gemeinschaft.

Lebenslauf - Monika Michaelsen

12.5.1954	geboren in Brilon-Wald (Nordrhein-Westfalen) als Tochter des Dipl.-Ing. Karl Michaelsen und seiner Ehefrau Margret geb. Schmale. Staatsangehörigkeit: deutsche.
1961 - 1965	Grundschule
1965 - 1975	Gymnasium mit abschließendem Abitur am 3.4.1975
Mai 1975 - April 1976	Laborhelferin bei den Vereinigten CW-Color-Betrieben in Oldenburg
1.4.1976	Beginn des Studiums an der Universität Oldenburg im Studiengang Diplom-Biologie
10.7.1978	Diplomvorprüfung
17.12.1982	Diplomprüfung an der Universität Oldenburg im Studiengang Diplom-Biologie
1983	Beginn der Promotion an der Universität Oldenburg
1.1.1983 - 31.1.1984	Examinierte wissenschaftliche Hilfskraft an der Universität Oldenburg innerhalb des vom BMFT (Projektträger: DFVLR) geförderten Forschungsvorhabens "Untersuchungen mit dem Ziel des Vorschlags biologischer Maßnahmen bei Ölverschmutzungen der Wattoberfläche und des Deichsvorlandes", Leitung Prof.Dr. Th. Höpner, Fachbereich Biologie
1.2.1984 - 31.12.1984	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im o.g. Vorhaben
1.4.1984 - 30.9.1984	Lehrauftrag an der Universität Oldenburg im Fachbereich Biologie
1.10.1984 - 15.10.1985	Wissenschaftliche Angestellte an der Universität Oldenburg - 10-stündige Vertretung einer Akademischen Ratsstelle

1.3.1985 - 15.10.1985	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Oldenburg innerhalb des von der EG ge- förderten Forschungsauftrags "Messungen des biologischen Ölabbaus auf und in Wattenmeer- sedimenten", Leitung Prof.Dr. Th. Höpner, Fachbereich Biologie
1.10.1985 - 31.3.1986	Lehraufträge an der Universität Oldenburg, Fachbereich Biologie
1.4.1986 - 30.9.1986	
1.10.1986 - 30.9.1988	Wissenschaftliche Angestellte an der Universität Oldenburg - 10-stündige Vertretung einer Akademischen Ratsstelle

Lebenslauf - Ulrike Kant

11.10.1956	geboren in Hamburg als Tochter des Kaufmanns Herbert Kant und seiner Ehefrau Hanna geb. Lobsien. Staatsangehörigkeit: deutsche.
1963 - 1967	Grundschule
1967 - 1975	Gymnasium mit abschließendem Abitur am 4.6.1975
1.8.1975 - 31.3.1976	Freiwilliges soziales Jahr
1.4.1976	Beginn des Studiums an der Universität Oldenburg im Studiengang Diplom-Biologie
3.7.1978	Diplomvorprüfung
17.12.1982	Diplomprüfung an der Universität Oldenburg im Studiengang Diplom-Biologie
1983	Beginn der Promotion an der Universität Oldenburg
1.1.1983 - 31.1.1984	Examinierte wissenschaftliche Hilfskraft an der Universität Oldenburg innerhalb des vom BMFT (Projektträger: DFVLR) geförderten Forschungsvorhabens "Untersuchungen mit dem Ziel des Vorschlags biologischer Maßnahmen bei Ölverschmutzungen der Wattoberfläche und des Deichsvorlandes", Leitung Prof.Dr. Th. Höpner, Fachbereich Biologie
1.2.1984 - 31.12.1984	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im o.g. Vorhaben
1.4.1984 - 30.9.1984	Lehraufträge an der Universität Oldenburg im Fachbereich Biologie
1.10.1984 - 31.3.1985	
1.4.1985 - 30.9.1985	
1.3.1985 - 15.10.1985	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Oldenburg innerhalb des von der EG geförderten Forschungsauftrags "Messungen des biologischen Ölabbau auf und in Wattenmeersedimenten", Leitung Prof.Dr. Th. Höpner, Fachbereich Biologie
15.10.1985 - 31.9.1986	Wissenschaftliche Angestellte an der Universität Oldenburg - 10-stündige Vertretung einer Akademischen Ratsstelle

